

MANUAL DE CAPACITAÇÃO NA DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* PARA MICROSCOPISTAS DE MALÁRIA E LABORATORISTAS DA REDE PÚBLICA



Ministério da Saúde

FOICRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

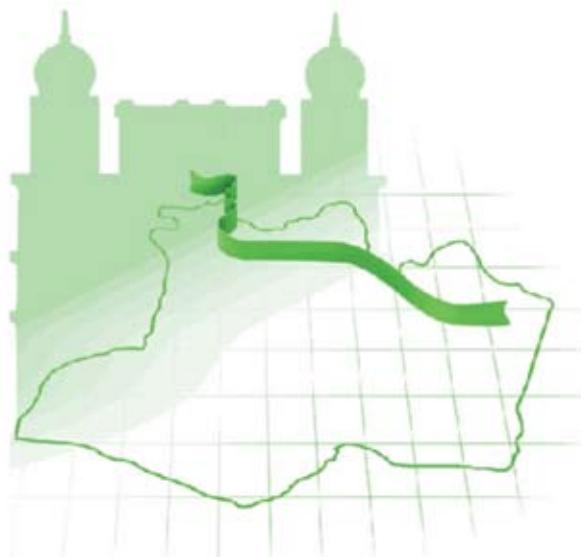


Organização
Pan-Americana
da Saúde



Escritório Regional para as Américas da
Organização Mundial da Saúde

**MANUAL DE CAPACITAÇÃO
NA DETECÇÃO DE
Trypanosoma cruzi
PARA MICROSCOPISTAS DE
MALÁRIA E LABORATORISTAS
DA REDE PÚBLICA**



***Laboratório de Doenças Parasitárias
Expansão Rio Negro
Medicina Tropical
IOC-Fiocruz***

Módulos I, II e III

**2^a edição
2011**

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS DESTA PUBLICAÇÃO

Laboratório de Doenças Parasitárias, IOC-Fiocruz;
Fundação Oswaldo Cruz;
Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS);
Departamento de Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas, OMS;

APOIO

Departamento de Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas, OMS;
Rede ePORTUGUÊSe da OMS.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / Fiocruz - RJ

D479

Manual de capacitação na detecção de *Trypanosoma cruzi* para microscopistas de malária e laboratoristas da rede pública / Angela Cristina Veríssimo Junqueira et al. - 2^a. ed.- Rio de Janeiro: SCV/ICICT, 2011.

xiii, 300 p. : il., mapas, tab., graf. ; 22 cm.

Inclui bibliografia.

Conteúdo: Módulo I - Módulo II – Anexos dos Módulos I e II – Módulo III – Anexos do Módulo III

Editor: José Rodrigues Coura

ISBN: 978-85-913443-1-4

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Diagnóstico laboratorial. 3. Parasitologia. 4. Morfologia.
I. Gonçalves, Teresa Cristina Monte. II. Moreira, Carlos José de Carvalho. III. Coura, José Rodrigues (ed.). IV. Organização Pan-Americana da Saúde. V. Organização Mundial da Saúde. VI. Fundação Oswaldo Cruz. VII. Laboratório de Doenças Parasitárias - Medicina Tropical. VIII. Título.

CDD 616.936 3

Inclui CD com o conteúdo do Manual em formato PDF e material de apoio.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução total ou parcial desta obra, desde que seja citada a fonte e não seja para qualquer fim comercial.

MANUAL DE CAPACITAÇÃO NA DETECÇÃO DE *Trypanosoma cruzi* PARA MICROSCOPISTAS DE MALÁRIA E LABORATORISTAS DA REDE PÚBLICA

EDITOR

José Rodrigues Coura

Pesquisador Titular /Chefe do Laboratório de Doenças Parasitárias - Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brasil.

AUTORES

Angela Cristina Veríssimo Junqueira

Pesquisadora do Laboratório de Doenças Parasitárias - Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brasil. Responsável pela elaboração do curso piloto original, do material didático das aulas teórico-práticas e professora.

Teresa Cristina Monte Gonçalves

Pesquisadora do Setor de Entomologia Médica e Forense do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brasil.

Responsável pela elaboração do material didático das aulas teórico-práticas do Módulo III e professora.

Carlos José de Carvalho Moreira

Pesquisador do Laboratório de Doenças Parasitárias - Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Brasil. Colaborador nos Módulos I e II, revisor da montagem final do material escrito e professor.

CONSULTORES

Pedro Albajar Viñas

Médico Coordenador do Programa de Controle da Doença de Chagas, Departamento de Controle de Doenças Tropicais Negligenciadas, Organização Mundial da Saúde (OMS). Consultor e professor.

Antônio Evandro Melo de Oliveira

Ex-Diretor-Presidente da Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (FVS-AM).

Bernardino Cláudio de Albuquerque

Diretor-Presidente da Fundação de Vigilância em Saúde do Estado do Amazonas (FVS-AM).

Jacenir Reis dos Santos Mallet

Pesquisadora/Chefe do Setor de Entomologia Médica e Forense do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses do IOC/FIOCRUZ.

Catarina Macedo Lopes

Tecnologista do Setor de Entomologia Médica e Forense do Laboratório de Transmissores de Leishmanioses do IOC/FIOCRUZ. Consultora e colaboradora na montagem da maioria das imagens do material impresso do Módulo III.

COLABORADORES

Preparação de todo o material didático para as aulas práticas dos Módulos I/II e envio de todo o material para os municípios alvo das capacitações.

Equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ:

Aline Andrade Santos

Amanda Coutinho de Souza

Deise Lucide de Oliveira Bras

Elton Batista de Faria

José de Souza Nogueira

Laura Cristina dos Santos

Maria Celeste Dias Spata

Maria José de Souza

Renata Bortolasse Miguel

Samuel Ferreira de Deus

Vanessa da Costa Neves

Preparação de lâminas de formas de cultura do *T.cruzi*
Laboratório de Ixodides - Referência Nacional em Vetores de Rickétsias do
IOC/FIOCRUZ:

Renato da Silva Júnior

Preparação do material didático para as aulas práticas do Módulo III.
Equipe do Setor de Entomologia Médica e Forense do Laboratório de
Transmissores de Leishmanioses do IOC/FIOCRUZ:

Adalberto José da Silva

Ana Paula Rufino Amaro Sant'anna

Cristina Santos da Silva

Leandro Borges Ramos

Nathanielly Rocha C. de Lima

Shênia Patrícia Corrêa Novo

Simone Caldas Teves

Simone Castro Simões de Souza

Simone Patrícia Carneiro de Freitas

Willian Marques

Preparação de parte das imagens, arte gráfica das apostilas e modelagem 3D.
Equipe do Serviço de Produção e Tratamento de Imagens do IOC/FIOCRUZ:

Genilton José Vieira

Angelo Chafin

Bruno Eschenazi da Silveira

Heloísa Maria Nogueira Diniz

Leonardo Perim

Rodrigo da Cunha Mexas

Márcio Gândara

Preparação de imagens, diagramação e projeto gráfico da edição atual:

Marcello Pelliccione (*projeto gráfico e diagramação*)

com o suporte da Equipe do Serviço de Comunicação Visual (SCV-ICICT/FIOCRUZ):

Bob Moreira (*tabelas*)

Flávia de Carvalho (*diagramação*)

Mara Lemos (*diagramação*)

Valéria de Sá (*capa*)

Preparação das cópias reprodutivas.

Equipe do Departamento de Ensino do IOC/FIOCRUZ:

Vanir Quintanilha Lamarão

Rosimeri Melo Sousa

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Anália Celencina Fagundes Gomes

Técnica de Nível Superior da Secretaria de Estado da Saúde (SESAU), Estado de Tocantins.

Envio de manuais e modelos de ficha do Programa de Controle da Doença de Chagas.

Armando Carlos Lopes e Soraya Batoreu de Azevedo

Departamento de Manutenção de Equipamentos – DEMEC/FIOCRUZ.

Pelo auxílio nos cálculos da força centrífuga e fornecimento da tabela de conversão.

Cleber Galvão

Pesquisador do Laboratório Nacional e Internacional de Referência em Taxonomia de Triatomíneos.

Cessão de exemplares de diferentes espécies de triatomíneos, da Coleção Entomológica Herman Lent, para ilustrações da apostila.

Daniel Tapias Morales

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP).

Pela preparação de parte das imagens da tese de doutorado da pesquisadora Angela C. V. Junqueira, apresentada no Departamento de Parasitologia da USP, que foram utilizadas nesta apostila.

Elizabeth Luz Sánchez Romani

Laboratório de Zoonosis Parasitaria (LZP), Centro Nacional de Salud (CNSP), Instituto Nacional de Salud (INS) - Peru.

Tradução do texto para o Espanhol na versão da apostila empregada no Curso de Capacitação realizado em Quito (Equador), 2008.

François Noireau*

Pesquisador do Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France.

Cessão de algumas imagens de *Triatoma infestans* que ilustram parte do Módulo III da apostila.

Jane Margaret Costa von Sydaw

Pesquisadora e Curadora da Coleção Entomológica do IOC/FIOCRUZ.

Cessão do exemplar da espécie *Panstrongylus geniculatus* para ilustração da apostila.

José Borges Pereira

Pesquisador do Laboratório de Doenças Parasitárias - Medicina Tropical – IOC/FIOCRUZ.

Fornecimento da cepa de *T.cruzi* (VL) empregada para infectar camundongos, visando à obtenção de lâminas de formas evolutivas do *T.cruzi* empregadas nas aulas práticas.

Júlio Cesar Miguel

Técnico do Laboratório de Doenças Parasitárias - Medicina Tropical - IOC/ FIOCRUZ.

Preparação de lâminas de fluorescência para ilustração.

* *In memoriam.*

Marco Aurélio Peregrino da Silva

Professor da Universidade do Rio de Janeiro - UNIRIO.

Fotografias de alguns exemplares de triatomíneos que ilustram parte do Módulo I/II da apostila.

Mariangela Ziccardi de Camargo Salles

Pesquisadora do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa Médica do IOC/FIOCRUZ.

Fornecimento do isolado de *T. rangeli* utilizado no preparo das lâminas empregadas nas aulas práticas do Módulo I/II e fotografias da pág. 122.

Matheus de Oliveira Rachid

Revisão ortográfica do texto.

Mirko Rojas Cortez

Programa Nacional de Control de Chagas (PNCCH), Ministerio de Salud, La Paz, Bolívia.

Cessão de uma das imagens de *Triatoma infestans* que ilustra o Módulo III da apostila.

Regina Ungerer

Médica e Coordenadora da Rede ePORTUGUÊSe da Organização Mundial da Saúde (OMS).

Difusão e distribuição mundial.

Sergio Luiz Bessa Luz

Pesquisador do Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane/FIOCRUZ.

Apoio logístico no Estado do Amazonas para o curso piloto.

Sonia Gumes Andrade

Pesquisadora do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/FIOCRUZ.

Cessão das imagens de formas amastigotas de *T. cruzi* em diferentes tecidos.

Prefácio

Esta apostila, originária do Laboratório de Doenças Parasitárias do Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, foi idealizada para cursos de capacitação de técnicos no diagnóstico parasitológico da infecção chagásica, na identificação de vetores e na conduta com pacientes com doença de Chagas na Amazônia Brasileira desde 2006, se transformou, em 2008, em um manual para uso nos nove países da Região Amazônica, graças ao apoio da Organização Pan-Americana da Saúde. Neste ano de 2012 está sendo lançada a 2^a edição revisada e atualizada para ser distribuída seguindo o mesmo fluxo da primeira. O manual é o fruto do esforço de vários profissionais - pesquisadores, técnicos e estudantes, particularmente das Dras. Angela Cristina Veríssimo Junqueira e Teresa Cristina Monte Gonçalves (coordenadoras) e dos Drs. Carlos José de Carvalho Moreira e Pedro Albajar Viñas, e tantos outros consultores e colaboradores, relacionados no seu início com as respectivas instituições a que pertencem.

O primeiro curso de capacitação de técnicos, organizado pela Dra. Angela C. V. Junqueira, foi realizado no Município de Barcelos, na Microrregião do Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil, em janeiro de 2006, como curso piloto, considerando que nesse Município o Laboratório de Doenças Parasitárias do IOC/Fiocruz mantém uma extensão, onde vem desenvolvendo pesquisas de campo nos últimos 20 anos. Tendo em conta o sucesso do primeiro curso e feitos os ajustes necessários, durante os anos de 2006 a 2007, o referido curso foi ministrado nos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) e três centros de pesquisa nas capitais dos nove estados da Amazônia Brasileira, com apoio operacional e financeiro de Médicos Sem Fronteiras (MSF). Essa iniciativa teve um grande êxito, considerando que, desde então, um aumento expressivo no número de casos agudos tem sido notificado naqueles estados. No ano de 2008, mais dois cursos foram ministrados no interior da Amazônia dentro do mesmo modelo proposto no curso de 2006. O mesmo ocorreu de 2009 a 2011, nos estados de Tocantins e Pará.

A estrutura do curso é modular, com a seguinte organização:

Módulo I (Teórico)

Apresentação do curso

Doença de Chagas e seu agente etiológico

Diagnóstico Laboratorial - Uma abordagem geral

Conduta com o indivíduo infectado e notificação

Caracterização do *T. cruzi*

Módulo II (Teórico e prático)

Diagnóstico Parasitológico do *Trypanosoma cruzi*

Aulas teóricas e práticas

Módulo III (Teórico e prático)

Identificação, biologia de triatomíneos e métodos de coleta

Aulas teóricas e práticas

Os Módulos I e II são ministrados em conjunto, na parte da tarde, durante cinco dias úteis da semana, visando não interromper as atividades de rotina dos técnicos; sendo essa mesma conduta implementada no Módulo III (módulo opcional).

Diante da experiência acumulada nos 14 cursos ministrados na Amazônia Brasileira, estamos certos de que esse modelo de curso poderá ter o mesmo êxito nos demais países da Região Amazônica.

Rio de Janeiro, outubro de 2011.

Prof. Dr. José Rodrigues Coura

Chefe do Laboratório de Doenças Parasitárias - Medicina Tropical
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

Cronograma Modelo do Curso de Capacitação

Tema das Aulas (Módulo I e Módulo II)		Datas	Horários
Apresentação do curso: seus objetivos e metas. Módulo I - Doença de Chagas: agente etiológico; reservatórios; vetores; mecanismos de transmissão; manifestações clínicas e tratamento. Dr. José Rodrigues Coura / Dr. Pedro Albajar Viñas	_____ / _____ / _____ segunda-feira	13:30 às 15:00	
Intervalo		15:00 às 15:15	
Doença de Chagas: agente etiológico, reservatórios, vetores, mecanismos de transmissão, manifestações clínicas e tratamento. (continuação) Dr. José Rodrigues Coura / Dr. Pedro Albajar Viñas		15:15 às 16:15	
Intervalo		16:15 às 16:30	
Diagnóstico laboratorial - uma abordagem geral. Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira.		16:30 às 18:30	
Conduta com o indivíduo infectado: avaliação epidemiológica e notificação dos casos. Considerações na coleta de dados: preenchimento de questionário epidemiológico (modelo do Min. da Saúde do Brasil). Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira	_____ / _____ / _____ terça-feira	13:30 às 15:00	
Apresentação de um vídeo do Ministério da Saúde sobre Doença de Chagas - Fim do Módulo I -		15:00 às 15:15	
Intervalo		15:15 às 16:15	
Módulo II - Diagnóstico laboratorial - uma abordagem específica: diagnóstico parasitológico. Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira.		16:15 às 16:30	
Intervalo		16:30 às 18:30	
<i>T.cruzi</i> : ciclo evolutivo no mamífero e no vetor. Aula prática: identificação de <i>Tcruzi</i> em lâminas de sangue, fezes e em macerado do tubo digestivo do vetor. Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira.	_____ / _____ / _____ quarta-feira	13:30 às 15:00	
Aula prática: identificação de <i>Tcruzi</i> em lâminas de sangue, fezes e em macerado do tubo digestivo de Triatomíneos. Desenhar as formas visualizadas ao microscópio. (continuação) Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira		15:00 às 15:15	
Intervalo		15:15 às 16:45	
Aula prática: identificação de <i>Tcruzi</i> em lâminas de sangue, nas fezes e em macerado do tubo digestivo do vetor. Verificação de ninhos de amastigosta em corte histológico. Desenhar as formas visualizadas ao microscópio. (continuação) Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira		16:45 às 17:00	
Intervalo		17:00 às 18:30	
Discussão de alguns casos agudos relatados na literatura científica, com enfoque ao diagnóstico parasitológico. Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira			
<i>T.rangeli</i> : ciclo evolutivo no mamífero e no vetor. Aula prática: identificação de <i>Trangeli</i> em lâminas de sangue. Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de Carvalho Moreira	_____ / _____ / _____ quinta-feira	13:30 às 15:00	
Intervalo		15:00 às 15:15	
<i>T.rangeli</i> : ciclo evolutivo no mamífero e no vetor. Aula prática: identificação de <i>Trangeli</i> em lâminas de sangue. Desenho das formas evolutivas visualizadas na lâmina. (continuação) Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de Carvalho Moreira		15:15 às 16:15	
Intervalo		16:15 às 16:30	
Intervalo		16:30 às 18:30	
<i>Blastocritídia</i> : ciclo evolutivo no inseto vetor. Aula prática: identificação de Blastocritídia em triatomíneos infectados experimentalmente. Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira - Fim do Modulo II -			
Avaliação dos conhecimentos teóricos que foram repassados no Módulo I e II (10 questões: 5 sobre o módulo I e 5 sobre o módulo II) Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira	_____ / _____ / _____ sexta-feira	13:30 às 15:00	
Intervalo		15:00 às 15:15	
Avaliação prática: identificação de <i>Tcruzi</i> e <i>T. rangeli</i> em diferentes amostras biológicas. Dra. Angela C.V. Junqueira - Dr. Carlos José de C. Moreira		15:15 às 16:15	
Intervalo		16:30 às 18:30	
Correção das duas avaliações junto com os alunos. Apresentação do vídeo sobre o Instituto Oswaldo Cruz. Encerramento das Atividades			

As aulas do Módulo I são direcionadas aos profissionais de saúde que atuam no programa de vigilância e controle. O Módulo II visa à capacitação exclusiva de microscopistas. É pré-requisito que os microscopistas participem dos módulos I e II, sendo o número limitado ao máximo de 10 profissionais para o módulo II. Cada profissional receberá um formulário para ser preenchido, que tem como objetivo verificar o seu perfil e tempo de atuação na função atual. Vide pasta verde após o cronograma.

Tema das Aulas (módulo III) OPCIONAL	Datas	Horários
Ordem Hemíptera: posição sistemática, conhecimento geral de triatomíneos e cimicídeos. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>	segunda-feira	13:30 às 15:00
Intervalo		15:00 às 15:15
Subfamília Triatomiae: morfologia externa, morfologia interna e fisiologia. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>		15:15 às 16:15
Intervalo		16:15 às 16:30
Subfamília Triatominae: biologia das principais espécies e aspectos ecológicos das espécies Amazônicas. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>		16:30 às 18:30
Métodos de coleta, preservação e transporte de triatomíneos. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>		13:30 às 15:00
Intervalo		15:00 às 15:15
Aula prática: métodos de coleta, preservação e transporte de triatomíneos. Preenchimento da Ficha de Notificação. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>		15:15 às 16:15
Intervalo		16:15 às 16:30
Aula prática: identificação das espécies de triatomíneos utilizando a chave dicotômica. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>		16:30 às 18:30
Aula prática: identificação das espécies de triatomíneos utilizando a chave dicotômica. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>	quarta-feira	13:30 às 15:00
Intervalo		15:00 às 15:15
Aula prática: identificação das espécies de triatomíneos utilizando a chave dicotômica. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>		15:15 às 16:45
Intervalo		16:45 às 17:00
Aula prática: identificação das espécies de triatomíneos através da chave dicotômica. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>		17: 00 às 18:30
Aula prática: identificação das espécies de triatomíneos através da chave dicotômica. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>	quinta-feira	13:30 às 15:00
Intervalo		15:00 às 15:15
Aula prática: identificação das espécies de triatomíneos através da chave dicotômica. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>		15:15 às 16:15
Intervalo		16:15 às 16:30
Outros métodos de identificação de triatomíneos: moleculares e bioquímicos. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves - Dra. Angela C. V. Junqueira</i>		16:30 às 18:30
Avaliação dos conhecimentos teóricos que foram repassados no Módulo III (10 questões do módulo III) <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves - Dra. Angela C. V. Junqueira</i>	sexta-feira	13:30 às 15:00
Intervalo		15:00 às 15:15
Avaliação prática: identificação das principais espécies de triatomíneos. <i>Dra. Teresa C. M. Gonçalves</i>		15:15 às 16:15
Correção das duas avaliações junto com os alunos. Apresentação do vídeo "Triatomíneos - o elo de uma enfermidade". Encerramento das Atividades do módulo III.		16:30 às 18:30

Sumário

MÓDULO I

INTRODUÇÃO: Doença de Chagas na Região Amazônica	01
1. O <i>Trypanosoma cruzi</i>	06
1.1 Diferentes estádios evolutivos do <i>T. cruzi</i>	08
1.2 Ciclo do <i>T. cruzi</i> no vertebrado	11
1.3 Ciclo do <i>Trypanosoma rangeli</i> no vertebrado	11
1.4 Ciclo do <i>T. cruzi</i> no invertebrado	11
1.5 Ciclo do <i>T. rangeli</i> no invertebrado	13
2. Outra espécie de tripanosomatídeo encontrada nos triatomíneos	14
2.1 <i>Blastocritidida sp</i>	14
3. Ciclos biológicos de transmissão	16
3.1 Ciclo doméstico	17
3.2 Ciclo peridoméstico	17
3.3 Ciclo silvestre	18
3.4 Ciclo de transmissão oral	20
4. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo <i>T.cruzi</i>	23
4.1 Exames parasitológicos diretos	25
4.1.1 Gota de sangue examinada a fresco	25
4.1.2 Distensão fina e gota espessa	25
4.1.3 Métodos de concentração de parasitas	26
4.1.4 Informações complementares	31
4.2 Exames parasitológicos indiretos	33
4.2.1 Xenodiagnóstico	33
4.2.2 Hemocultura	35
4.2.3 Xenocultura	35
4.2.4 Inoculação em animais de laboratório	36
5. Emprego dos métodos parasitológicos	37
5.1 Caso suspeito de Chagas agudo	37
5.2 Caso suspeito de Chagas congênito	37
6. Diagnóstico molecular	38
6.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	38
6.2 PCR qualitativa	40
6.3 PCR quantitativa	42
6.4 Estudo comparativo entre a PCR e outros métodos de detecção do <i>T. cruzi</i>	42
6.5 Vantagens e desvantagens do emprego da PCR na detecção do <i>T. cruzi</i>	43
7. Diagnóstico sorológico	44
7.1 Diagnóstico individual	46
7.2 Inquéritos soroepidemiológicos	46
7.3 Avaliação das provas sorológicas	46
7.4 Provas/testes mais utilizados atualmente	48
7.4.1 Imunofluorescência indireta - IFI	48

7.4.2 Hemaglutinação indireta	49
7.4.3 Ensaio imunoenzimático - ELISA	50
7.4.4 Western-Blot	52
7.4.5 Testes de execução simplificada	53
7.5 Aplicação dos métodos sorológicos	56
7.5.1 Triagem de indivíduos em bancos de sangue	56
7.5.2 Triagem de indivíduos de regiões endêmicas para realização dos exames parasitológicos	57
7.5.3 Modelo de investigação epidemiológica	58
8. Complexo <i>Trypanosoma cruzi</i>	59
8.1 Caracterização biológica	59
8.2 Caracterização bioquímica	61
8.3 Caracterização molecular utilizando kDNA	62
8.4 Caracterização molecular utilizando DNA nuclear	62
8.4.1 Tipagem pelo gene de mini-exon	62
8.4.2 Tipagem pelo DNA polimórfico amplificado (RAPD)	64
8.4.3 Tipagem através das regiões intergênicas dos genes ribossômicos	65
8.4.4 Tipagem por microssatélites	66
8.4.5 Classificação atual por DTUs	68

MÓDULO II

1. Métodos parasitológicos diretos	71
1.1 Fundamento	71
1.2 Coleta da amostra	71
2. Protocolos	71
2.1 Exame de sangue a fresco	71
2.1.1 Procedimento	72
2.2 Distensão fina ou esfregaço	72
2.2.1 Confecção e coloração das distensões	73
2.3 Gota espessa	76
2.3.1 Coleta de sangue	79
2.3.2 Protocolo de coloração 1	80
2.3.3 Protocolo de coloração 2	81
3. Outros métodos de coloração	83
3.1 Giemsa tamponado (após hidrólise ácida)	83
3.2 Coloração de lâminas de fezes de triatomíneos	84
3.3 Coloração de lâminas de fezes e de tubo digestivo de triatomíneos	85
3.4 Técnica de coloração de lâminas de fezes baseado nos métodos dos laboratoristas de Tocantinópolis (TO)	87
4. Avaliação das colorações	89
4.1 Esvagaço	89
4.2 Gota espessa	90
5. Procedimento básico para exame do material corado	91
6. Preparo de soluções para coloração	92

6.1 Solução corante de Giemsa	92
6.2 Solução de Errecart	93
6.3 Giemsa alcalino	93
6.4 Composição da água tamponada utilizada na coloração de Giemsa (pH=6,8).	93
6.5 Composição do tampão de coloração (pH=7,2)	94
6.6 Corantes e diluentes para o método de Walker	94
7. Procedimentos de exame de triatomíneos	96
7.1 Exame das fezes de triatomíneos	96
7.2 Exame do tubo digestivo de triatomíneos	96
7.3 Exame da hemolinfa	97
7.4 Exame da glândula salivar (diagnóstico diferencial com <i>T. rangeli</i>)	98
8. Recomendações importantes	98
BIBLIOGRAFIA	100

ANEXOS DOS MÓDULOS I E II

1. Morfometria do <i>Trypanosoma cruzi</i>	113
2. Morfologia das formas epimastigota e tripomastigota do <i>T. cruzi</i>	117
2.1 Aspectos morfológicos do <i>T. cruzi</i> e do <i>T. rangeli</i>	117
2.2 Tripomastigotas encontrados em esfregaços do sangue de macacos-de-cheiro naturalmente infectados	122
2.3 Aspectos morfológicos de formas sanguíneas	123
3. Portaria nº 2472 de 31/08/2010 - D.O.U., 01/09/2010	124
4. Ficha de notificação de Doença de Chagas aguda - SINAN	126
5. Proposta de fluxograma para notificação de casos de infecção por <i>T. cruzi</i>	128
6. Proposta de fluxograma para notificação de casos de infecção por <i>T. rangeli</i>	129
7. Proposta de fluxo de revisão e controle de qualidade das lâminas com amostras de sangue	130
8. Proposta de fluxograma para conduta a partir da coleta/captura de triatomíneos	131
9. Método tradicional de avaliação de parasitemia	132
10. Avaliação da pesquisa de DCA	133
10.1 Avaliação 1	133
10.2 Avaliação 2	135
10.3 Avaliação 3	137
11. Cálculo do fator de correção de um microscópio	138
12. Cálculo da força centrífuga relativa	139
12.1 Cálculo do raio máximo	139
12.2 Cálculo de <i>g</i> ou <i>rpm</i> a partir de duas variáveis conhecidas	140
12.3 Utilizando o nomograma de força centrífuga	140
12.4 Utilizando a fórmula matemática	140
13. Procedimento de punção digital para coleta de sangue	143
14. Montagem permanente de lâminas coradas utilizando Entellan®	145

15. Principais procedimentos de biossegurança em laboratório de parasitologia	146
15.1 Regras gerais	146
15.2 Principais equipamentos de proteção individual (EPIs)	148
16. Conceitos e normas referentes à desinfecção, esterilização e limpeza	151
17. Principais compostos desinfetantes	152

MÓDULO III

1. Estudo dos triatomíneos	155
1.1 Introdução	155
1.2 Posição sistemática dos triatomíneos	158
2. Aspectos gerais	159
2.1 Morfologia externa	159
2.2 Conhecendo e diferenciando os gêneros de triatomíneos	165
3. Aspectos da biologia	168
3.1 Ciclo de vida	168
3.2 Resistência ao jejum e defecação	172
3.3 Dispersão dos triatomíneos	174
3.4 Inimigos naturais	176
4. Aspectos da ecologia	176
4.1 Tipos de ambiente onde os barbeiros podem ser encontrados	176
4.1.1 Domiciliar e peridomiciliar	176
4.1.2 Silvestre	176
5. Algumas espécies da Amazônia legal	180
5.1 Ilustração das espécies	182
6. Morfologia interna	185
6.1 Sistema digestivo	185
6.2 Sistema respiratório	188
6.3 Sistema circulatório	188
7. Chaves dicotônicas para identificação das espécies de triatomíneos	190
8. Relação das espécies de triatomíneos descritas ou revalidadas	230
9. Morfologia externa dos triatomíneos	237
9.1 Aspectos morfológicos externos e nomenclatura das estruturas	237
9.2 Ilustrações das chaves dicotônicas	243
10. Técnicas	248
10.1 Captura de triatomíneos	248
10.2 Transporte dos insetos coletados	257
10.3 Montagem dos triatomíneos coletados	261
10.4 Investigação entomológica	265
10.5 Dissecção do inseto	266
10.6 Identificação da fonte alimentar	269
10.6 Material utilizado para dissecção	271
BIBLIOGRAFIA	272
ANEXOS DO MÓDULO III	279

A DOENÇA DE CHAGAS NA REGIÃO AMAZÔNICA

José Rodrigues Coura, Carlos José de Carvalho Moreira, Angela C.V. Junqueira
Laboratório de Doenças Parasitárias, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz
Av. Brasil, 4365 – Rio de Janeiro – RJ – 21040-360

O risco da doença de Chagas se tornar endêmica na Região Amazônica (a maior floresta tropical do mundo, habitada por mais de 30 milhões de pessoas) está relacionado à intensa migração de pessoas de áreas com incidência significativa da doença, carregando parasitos e vetores já adaptados ou pela adaptação de vetores e animais silvestres (infectados com o *Trypanosoma cruzi*) ao domicílio humano, em consequência do desflorestamento incontrolado na região. A grande região no Brasil e no conjunto dos países amazônicos, correspondendo a uma vasta área de 7.702.264 km² (Figura 1), é denominada Panamazônia.

Mais de 25 espécies de triatomíneos silvestres de nove gêneros e dezenas de espécies de reservatórios já foram descritas na região, a maioria infectada pelo *Trypanosoma cruzi*.

A invasão das casas por triatomíneos silvestres adultos (que vivem em palmeiras próximas) atraídos pela luz é muito frequente na região amazônica (Figura 2).

Da mesma forma, a presença de animais silvestres, principalmente *Didelphis marsupialis*, com elevadas taxas de infecção pelo *T. cruzi* tem sido encontrada no peridomicílio e intradomicílio naquela região.

Um número crescente de casos agudos da doença de Chagas tem sido descrito praticamente em todos os nove países da região amazônica, alguns deles em surtos epidêmicos atribuídos a transmissão oral através de alimentos contaminados (sucos de frutas, carne mal cozida de animais silvestres e outros alimentos contaminados).



Figura 1: Panamazônia. Seu território é ocupado pelos seguintes países: Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname, Venezuela e o território ultramarino da França, a Guiana Francesa.

Casos crônicos da doença com cardiopatia grave têm sido documentados, principalmente em coletores de fibra da piaçava na região do Rio Negro, na Amazônia Brasileira.

Um programa de vigilância que contemple os perfis de transmissão na Panamazônia deve ser implementado de forma continuada e uniforme nos próximos anos. É consenso que em curto e médio prazo se evite a endemização da doença de Chagas na região. Ações planejadas de controle e prevenção devem ser inseridas para

evitar que se reproduza o perfil das áreas endêmicas clássicas com estabelecimento do triatomíneo no intra e peridomicílio.

Em 2004 foi criada a Iniciativa Internacional para Vigilância e Prevenção da Enfermidade de Chagas na Região Amazônica (AMCHA), já tendo sido realizada a 6^a reunião e diversos cursos para treinamento de técnicos, no reconhecimento do *T. cruzi* em lâminas na rotina do diagnóstico de malária.



Figura 2: Habitat de triatomíneos silvestres e de *Didelphis marsupialis* infectados com *T. cruzi* na região amazônica.

REFERÊNCIAS PARA CONSULTA

- AGUILAR, M. M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS J.C.P.; JUNQUEIRA A.C.V.; COURAS, J.R. Chagas disease in the Amazon Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102 (Suppl. I), p. 47-55, 2007.
- ALBAJAR, P.V.; LAREDO, S.V.; TERRAZAS, M.B.; COURAS, J.R. Miocardiopatia dilatada em pacientes com infecção chagásica crônica. Relato de dois casos fatais autóctones do Rio Negro, Estado do Amazonas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, p. 82-89, 2003.
- BRENER, Z. ; ANDRADE, Z.A. ; BARRAL-NETTO, M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan 2^a Edição, Rio de Janeiro, 431 p. 2000. (Excelente livro para quem deseja especializar-se no assunto).
- COURAS, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, (Suppl I), p.113-122, 2007.
- COURAS, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V., CARVALHO-MOREIRA, C.J.; BORGES-PEREIRA, J; ALBAJAR VIÑAS, P. Uma visão sistêmica da endemia chagásica. In: Silveira AC, *La Enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años de una endemia americana ancestral*. Organización Panamericana de la Salud y Fundación Mundo Sano, Washington DC y República Argentina. Publicación Monográfica 7, p. 25-35, 2007.
- DIAS, J.C.P.; COURAS, J.R. *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 1997. 486 p.
- DIAS, J.C.P.; MACEDO, V.O. Doença de Chagas. In: JR Coura, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p. 555-593.
- E. CHOW-SHAFFER, E.; SINA, B.; HAWLEY, W.A.; DE BENEDICTIS, J.; SCOTT, T.W. Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 37, p. 492 - 502, 2000.

KIRSTEIN, F.; GRAY, J.S. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of Lyme Borreliosis by Analysis of the Blood-meal in Its European Vector *Ixodes ricinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 4060 - 65, 1996.

JUNQUEIRA, A.C.V.; ALBAJAR, P.V.; COURAS, J.R. Doença de Chagas na Amazônia Brasileira. In: JR Coura, *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p. 595-603.

MOTA, J.; CHACON, J.C.; GUTIERREZ-CABRERA, A.E.; SANCHEZ-CORDERO, V.; WIRTZ, R.A. Identification of blood meal source and infection with *Trypanosoma cruzi* of Chagas disease vectors using a multiplex cytochrome b polymerase chain reaction assay. *Vector Borne Zoonotic Disease*, v. 7, p. 617– 27, 2007.

MUKABANA, W.R.; TAKKEN, W.; KNOLS, B.G. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. *Trends in Parasitology*, v.18, p. 505 – 09, 2002.

PIZARRO, J.C.; STEVENS, L. A new method for forensic DNA analysis of the blood meal in chagas disease vectors demonstrated using *Triatoma infestans* from Chuquisaca, Bolivia. *PLoS One*. v. 3, p. 3585, 2008.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P.H. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). *Parasitology Research*, v. 97, 247 -54, 2005.

TOWNZEN, J. S.; BROWER, A. V.; JUDD, D. D. Identification of mosquito bloodmeals using mitochondrial cytochrome oxidase subunit I and cytochrome b gene sequences. *Medical and Veterinary Entomology*, v. 22, p. 386 - 93, 2008.

XAVIER, S.S.; SOUZA, A.S.; ALBAJAR, P.V.; JUNQUEIRA, A.C.V.; BÓIA, M.N.; COURAS, J.R. Cardiopatia chagásica crônica no Rio Negro, Estado do Amazonas. Relato de três novos casos autóctones, comprovados por exames sorológicos, clínicos radiográficos do tórax e ecocardiográficos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, p.211-216, 2006.

1. O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (Chagas 1909), é um protozoário pertencente ao filo **Sarcomastigophora**, subfilo **Mastigophora**, classe **Zoomastigophora**, ordem **Kinetoplastida**, subordem **Trypanosomatina** e família **Trypanosomatidae**.

Essa espécie de parasita desenvolve o seu ciclo de vida em hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos), onde assume estádios evolutivos diferentes (Hoare 1972). Assim como outros Kinetoplastidas, o *T. cruzi* contém uma organela característica, chamada cinetoplasto. O DNA, ou KDNA, contido nessa organela constitui-se de moléculas organizadas em forma de maxicírculos e minicírculos.

Entre os hospedeiros mamíferos do *T. cruzi* está o homem, no qual se desenvolve uma infecção cuja resultante é a doença de Chagas. Essa infecção é autóctone nas Américas, onde se estima uma prevalência entre 10 a 12 milhões de pessoas infectadas.

Entre as possíveis formas de transmissão do *T. cruzi* ao homem, as consideradas mais importantes são a vetorial ou contaminativa (entre 70 e 90 % dos casos), a transfusional (1 a 20 %) e a congênita (0.5 a 10 %).

Na vetorial a contaminação ocorre por soluções de continuidade na pele ou mucosas íntegras em contato com fezes infectadas eliminadas durante ou após o repasto sanguíneo. Até a presente data já foram descritas 141 espécies de triatomíneos, potencialmente transmissoras do *T. cruzi*, classificadas em 5 tribos e 15 gêneros. A transmissão transfusional pode variar entre 12,5% e 25% para cada 500 ml de sangue total transfundido, especialmente na ausência de controle de qualidade em bancos de sangue.

Acredita-se que a transmissão congênita ocorra principalmente após o segundo trimestre de gestação. Outros modos de transmissão são: por via digestiva (oral), tipicamente em forma de surtos; accidental

e através de transplantes de órgãos. Excepcionalmente, pode ocorrer a transmissão por via sexual e por vetores não triatomíneos (ex: Cimicídeos).

O *T. cruzi* pode ser encontrado infectando hospedeiros nos mais diferentes ecótopos: nos desertos norte-americanos, nos altiplanos andinos, nas florestas amazônica e atlântica e no complexo caatinga-cerrado-pampa úmido. Dentre esses ecótopos, alguns albergam outras espécies de tripanossomos (Figura 3), como o *Trypanosoma rangeli* (Tejera 1920), que compartilha com o *T. cruzi* a capacidade de infectar mamíferos e triatomíneos (Tabela 1). O *T. rangeli*, porém, não é patogênico para o homem apesar de ser encontrado infectando o mesmo. Esses dados devem ser considerados nos estudos envolvendo ambas as espécies, já que compartilham formas evolutivas semelhantes. O esquema do ciclo evolutivo e a forma de transmissão vetorial de ambas as espécies são expostos nas páginas seguintes.

Tabela 1: Exemplos de subgêneros e espécies de tripanossomas, com a secção de desenvolvimento no vetor e tipo de transmissão e fluido infectado segundo Hoare (1972).

Subgênero e exemplo de espécie de tripanossoma	Secção de desenvolvimento no vetor	Tipo de transmissão e fluido infectado do vetor
Schizotrypanum - <i>T. cruzi</i>	Tubo digestivo	Contaminativa, fezes
Megatrypanum - <i>T. theileri</i>	Tubo digestivo	Contaminativa, fezes
Tejeraia - <i>T. rangeli</i> *	Tubo digestivo e glândula salivar	Inoculativa, saliva
Trypanozoon - <i>T. brucei</i>	Tubo digestivo e glândula salivar	Inoculativa, saliva
Duttonella - <i>T. vivax</i>	Tubo digestivo e glândula salivar	Inoculativa, saliva
Nannomonas - <i>T. congolense</i>	Tubo digestivo e glândula salivar	Inoculativa, saliva
Picnomonas - <i>T. suis</i>	Tubo digestivo e glândula salivar	Inoculativa, saliva

(*) Não existe consenso sobre a classificação taxonômica do *T. rangeli*. Alguns autores o classificam na seção *Stercoraria* e outros na *Salivaria*, apesar da transmissão ser principalmente inoculativa. Os autores sugerem como leitura complementar o capítulo Tripanossomíase rangeli do livro *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias* (COURA et al., 2005).



Figura 3: Origem geográfica de 4 diferentes grupos de *T. rangeli* (A■, B●, C◆, D★) identificados no estudo filogenético de Maia da Silva, F. et al. (2004).

1.1 DIFERENTES ESTÁDIOS EVOLUTIVOS DO *T. cruzi*

O *T. cruzi* apresenta formas evolutivas com aspectos morfológicos distintos, tanto no organismo vertebrado como no inseto vetor. A superfície celular dessas diferentes formas é constituída por macromoléculas de composição variável, o que reflete na interação do parasita com a célula hospedeira. Além das três principais formas abordadas nas páginas seguintes, uma série de outras formas intermediárias podem também ser observadas.

A forma **amastigota** de multiplicação intracelular é encontrada em mamíferos e também em cultivo celular (Figura 4).

Depois que os tripomastigotas invadem as células (por fagocitose, endocitose ou penetração ativa), para não serem destruídos pelo sistema imune do hospedeiro, transformam-se nas formas amastigotas.

Estas se localizam nas fibras musculares esqueléticas, cardíacas e lisas, células do sistema monocítico fagocitário, sistema nervoso central e sistema nervoso periférico. Em pacientes imunodeprimidos esse tropismo pode se modificar.

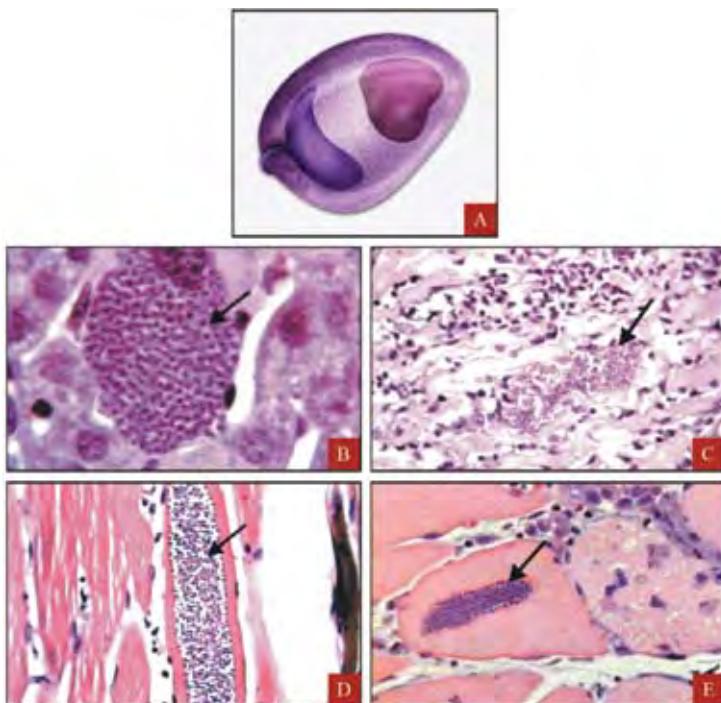


Figura 4: Forma amastigota de *T. cruzi*: B) amastigota em um macrófago; C) amastigota no coração; D, E) amastigotas no megaesôfago.

Fotografias de Sônia Gumes Andrade - CPqGM/FIOCRUZ.

O **epimastigota** é a forma de multiplicação no intestino do inseto (Figura 5). A multiplicação ocorre por divisão binária longitudinal. Essa forma, também encontrada nos meios axênicos (*in vitro*), está presente na fase exponencial de crescimento. Os antígenos de superfície de epimastigota são tradicionalmente utilizados nas provas sorológicas de diagnóstico e como antígeno nas reações de imunofluorescência indireta.

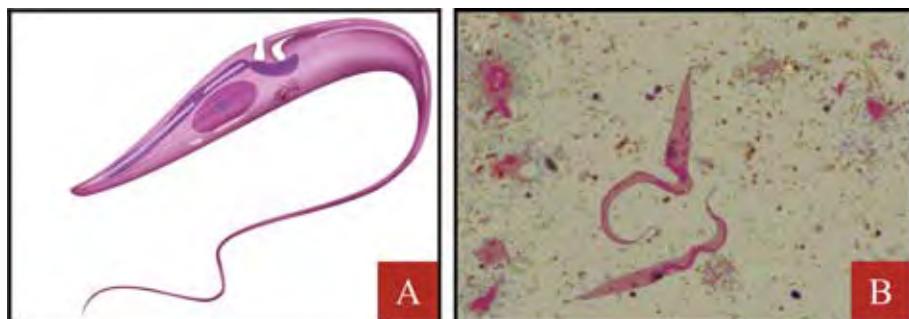


Figura 5: Forma epimastigota de *T. cruzi*: A) desenho; B) epimastigota em esfregaço de fezes de triatomíneo.

Desenho de Bruno Eschenazi. Fotografia de Carlos José de C. Moreira - IOC/FIOCRUZ.

O **tripomastigota** é uma forma do *T. cruzi* que não se multiplica. É encontrado no inseto vetor (tripomastigota metacíclico), no sangue e espaço intercelular e também na cultura de células. As formas encontradas no sangue podem apresentar-se com morfologias distintas, podendo ser classificadas como forma delgada, larga e muito larga (polimorfismo). Na figura 6 apresentam-se exemplos da forma larga e delgada.



Figura 6: Forma tripomastigota de *T. cruzi*. A) desenho; B, C) formas larga e delgada do *T. cruzi*, respectivamente.

Desenho de Bruno Eschenazi. Fotografias de Carlos José de C. Moreira - IOC/FIOCRUZ.

1.2 CICLO DO *Trypanosoma cruzi* NO VERTEBRADO

O triatomíneo infectado, ao sugar o sangue, deposita suas fezes contendo formas tripomastigotas metacíclicas normalmente perto do local da picada. Essas formas penetram por uma solução de continuidade na pele ou através das mucosas íntegras. Dentro do organismo do vertebrado, os tripomastigotas invadem diferentes tipos de células, transformando-se em amastigotas. O parasita tem tropismo por células musculares estriadas e lisas, macrófagos e também por células epiteliais e fibroblastos. As formas amastigotas dividem-se por divisão binária, formando “pseudocistos” que se rompem. Dentro destes pseudocistos, os amastigotas transformam-se em tripomastigotas que são liberados, após a ruptura da célula, atingindo a circulação sanguínea, indo infectar novas células (Figura 7 A).

1.3 CICLO DO *Trypanosoma rangeli* NO VERTEBRADO

Até hoje não é conhecida a forma e o local da multiplicação do parasita nos hospedeiros vertebrados. No homem a infecção é considerada benigna e pode persistir por até um ano e meio sem manifestações clínicas. De forma excepcional, em 1951, o Dr. Torrealba (apud Pessoa, S. B.), em seus estudos na Venezuela, relatou casos agudos da infecção no homem, descrevendo sintomas equivalentes à infecção por *T. cruzi*, como febre, poliadenite, hepatoesplenomegalia e anemia (Figura 7 B).

1.4 CICLO DO *T. cruzi* NO INVERTEBRADO

O inseto vetor pica os hospedeiros vertebrados infectados, sugando tripomastigotas presentes na corrente sanguínea. As formas tripomastigotas transformam-se em epimastigotas e esferomastigotas, à medida que migram pelas diferentes porções do intestino do inseto. As formas epimastigotas colonizam preferencialmente o intestino médio. Neste local, as formas epimastigotas multiplicam-se intensamente por divisão binária. Após ocorrer a adesão do parasita ao epitélio, através do flagelo, alguns desses epimastigotas transformam-se em

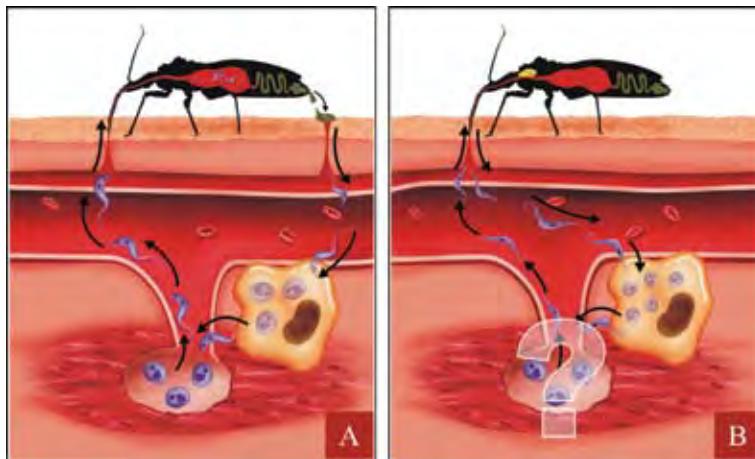


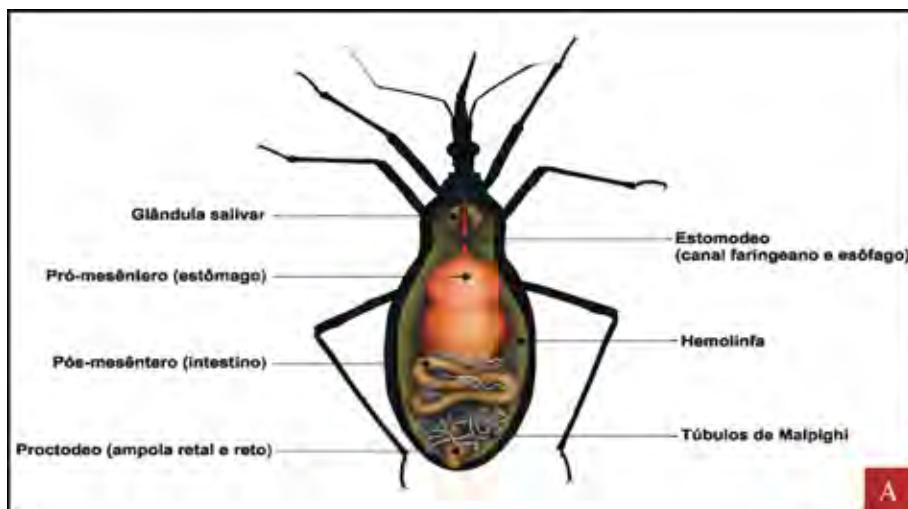
Figura 7: Esquemas representativos dos ciclos de vida do *T. cruzi* (A) e do *T. rangeli* (B).

Figura adaptada de REY, L. Parasitologia. 3^a ed.: Guanabara Koogan, 2001, por Bruno Eschenazi, Angela C. V. Junqueira e Carlos José de C. Moreira - IOC/FIOCRUZ.

tripomastigotas na porção final do tubo digestivo (ampola retal). As formas resultantes dessa transformação, denominada metaciclogênese, são denominadas tripomastigotas metacíclicas (formas infectantes), que são encontradas principalmente no reto do inseto vetor. As formas esferomastigotas também podem transformar-se diretamente em formas metacíclicas. As formas infectantes são eliminadas com as fezes ou com a urina, quando o inseto pica novamente um outro indivíduo, pois esses insetos têm o hábito frequente de defecar durante ou logo após o repasto sanguíneo. O processo de metaciclogênese ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor. Este fenômeno é regulado pela interação de produtos da secreção intestinal e por produtos derivados da digestão do sangue ingerido (Carvalho-Moreira *et al.*, 2003), assim como pela falta destes últimos (redução de nutrientes), pois os triatomíneos por vezes podem ficar privados de alimentação por muito tempo na natureza. A metaciclogênese pode também ser conseguida *in vitro*, em condições químicas definidas através do estresse nutricional, através da incubação em um meio de diferenciação artificial denominado TAU 3AAG, por exemplo.

1.5 CICLO DO *T. rangeli* NO INVERTEBRADO

O *T. rangeli* foi descrito pela primeira vez na Venezuela, em 1920 (Tejera, 1920), como sendo uma espécie de parasita encontrada exclusivamente na América Central e na América do Sul, onde apresenta maior prevalência na primeira e no Noroeste da América do Sul. Compartilha hospedeiros mamíferos e vetores com o *T. cruzi*. A primeira descrição de infecção humana comprovada no Brasil foi feita por Coura *et al.*, em 1996. Em condições naturais, o triatomíneo ingere o sangue de algum mamífero infectado com as formas tripomastigotas sanguíneas. Essas se transformam em epimastigotas na parte média do trato digestivo do triatomíneo. O *T. rangeli* consegue atravessar o epitélio do intestino do barbeiro, invadindo a hemolinfa. Uma vez na hemolinfa, ativa o sistema de defesa do inseto. Quando consegue escapar deste sistema de defesa, o parasita atinge as glândulas salivares, onde realiza a metacilogênese, transformando-se na forma tripomastigota metacíclica infectante, que será transmitida a outro mamífero pela picada. A seguir, são mostradas a anatomia do tubo digestivo do triatomíneo e a morfologia das principais formas evolutivas do *T. cruzi* e do *T. rangeli* no inseto vetor (Figuras 8A, 8B e 8C).



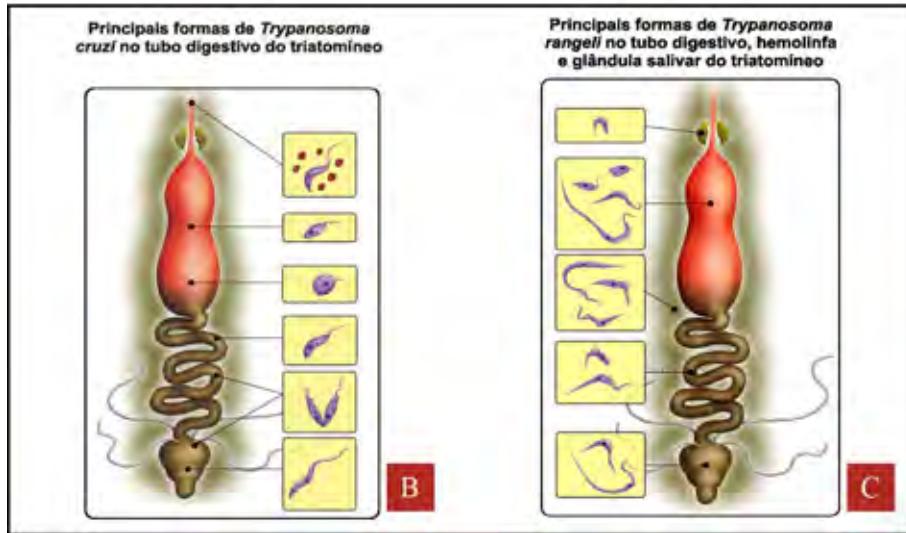


Figura 8: Anatomia interna do triatomíneo (A) e principais formas evolutivas do *T. cruzi* (B) e *T. rangeli* (C) no inseto vetor.

Figuras desenhadas por Bruno Eschenazi, elaboradas por Angela C.V. Junqueira e Carlos José de C. Moreira.

2. OUTRA ESPÉCIE DE TRIPANOSOMATÍDEO ENCONTRADA NOS TRIATOMÍNEOS

2.1 *Blastocrithidia* sp

Alguns triatomíneos capturados no campo podem albergar naturalmente o tripanossomatídeo monogenético *Blastocrithidia* sp. A forma de transmissão ocorre quando um inseto se alimenta das fezes de outro inseto (coprofagismo-CO) ou quando ele se alimenta em outro inseto (canibalismo-CA), porém na natureza isso não é frequente. As possibilidades de contaminação aumentam quando os triatomíneos são mantidos em áreas restritas, como ocorre nos insetários, quando o jejum é prolongado. Nessas situações eles tendem a praticar a coprofagia e possivelmente o canibalismo, o que facilita o processo de transmissão. As figuras 9 e 10 demonstram respectivamente o ciclo evolutivo e formas epimastigotas de *Blastocrithidia triatomae*.

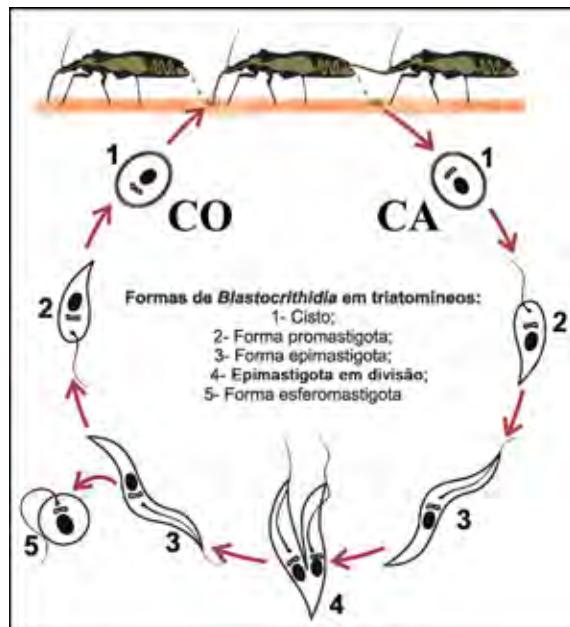


Figura 9: Ciclo da *Blastocrithidia* sp.

Figuras adaptadas por Bruno Eschenazi, Angela C.V. Junqueira e Carlos José de C. Moreira
do site: <http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de/login/n/h/0163.html>).

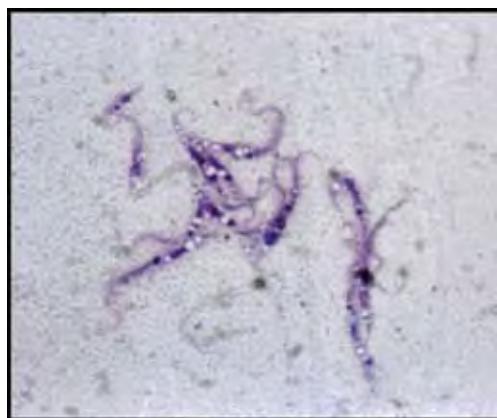


Figura 10: Formas epimastigotas de *Blastocrithidia triatomae*.

Foto de Angela C. V. Junqueira.

3. CICLOS BIOLÓGICOS DE TRANSMISSÃO

Segundo Dias (1958) e Forattini (1980), o ciclo primitivo do *T. cruzi* é de natureza enzoótica, circulando o parasita entre vetores e reservatórios silvestres (Figura 11). A doença de Chagas humana é uma situação recente, causada pelo crescimento e dispersão da população humana com a consequente aproximação dos locais onde existe esse ciclo.

Podemos dizer que a doença de Chagas foi e continua sendo uma endemia basicamente rural, de populações de baixa renda e de pouca cultura, que vivem em condições precárias, onde ela não foi erradicada, favorecendo a domiciliação de algumas espécies vetoras, dando origem ao chamado ciclo doméstico do parasita. Entretanto, esse quadro vem se modificando com o sucesso de alguns programas de controle.



Figura 11: Ciclos biológicos do *Trypanosoma cruzi*.

Ref: Pessoa, S. 1962. Domiciliação dos triatomíneos e epidemiologia da doença de Chagas. Arq. Hig. Saúde Pub. 27 (92): 161-171.

Outros perfis têm sido descritos. Triatomíneos silvestres podem infectar o homem e os animais domésticos em seu habitat natural, levando ao aparecimento de casos ocasionais da doença de Chagas, denotando a não necessidade de triatomíneos domiciliados para que ocorra a transmissão vetorial.

As páginas seguintes ilustram diferentes modelos de ciclos biológicos do *T.cruzi* e algumas das principais espécies de triatomíneos existentes na Região Amazônica. Nos últimos anos vem merecendo a atenção o número crescente de casos agudos na região onde não têm sido descritas espécies domiciliadas com exceção do *Triatoma maculata*.

3.1 CICLO DOMÉSTICO

Os triatomíneos, que são insetos estritamente hematófagos, podem encontrar em algumas habitações humanas as condições ideais de sobrevivência, possuindo abrigo e oferta alimentar, tornando-se insetos domiciliados (Figura 12A). Esse fenômeno (domiciliação) tornou a transmissão vetorial o principal mecanismo primário da propagação da doença de Chagas. A domiciliação e a colonização mostraram-se eficientes para certo número de espécies, como por exemplo, o *Triatoma infestans* no Brasil.

3.2 CICLO PERIDOMÉSTICO

Algumas espécies de triatomíneos podem assumir uma biologia especial, adaptando-se a viver em áreas em torno das habitações humanas, como telheiros, sótãos, chiqueiros, galinheiros etc, nutrindo-se do sangue de animais domésticos, conforme o exemplo da Figura 12 B. No Brasil, entre as principais espécies de triatomíneos encontradas neste modelo de ciclo biológico, podemos citar o *Triatoma sordida* e *T. pseudomaculata*.

É importante ressaltar que uma mesma espécie pode ser encontrada tanto no domicílio como no peridomicílio.



Figura 12: Ciclos biológicos doméstico (A) e peridoméstico (B) do *T. cruzi*.

Desenho de Bruno Eschenazi e Angela C.V. Junqueira.

3.3 CICLO SILVESTRE

O aparecimento da doença de Chagas ocasional, como demonstrado em algumas áreas da Região Amazônica, vem sendo verificado entre os trabalhadores que extraem as fibras da palmeira *Leopoldinia piassaba*. Esses trabalhadores ficam expostos ao contato com triatomíneos da espécie *Rhodnius brethesi*, denominados localmente de piolhos da piaçava, que habitam a referida palmeira. Esse contato é contínuo, uma vez que o extrativista fixa sua moradia perto do local de extração.

A Figura 13 demonstra possíveis formas de infecção do homem no ambiente silvestre pelo *T. cruzi*: por exposição ao vetor durante o trabalho de extração da fibra (Figura 13A) ou pela exposição à picada durante à noite em colocações, nos locais de acampamento (Figura 13B).

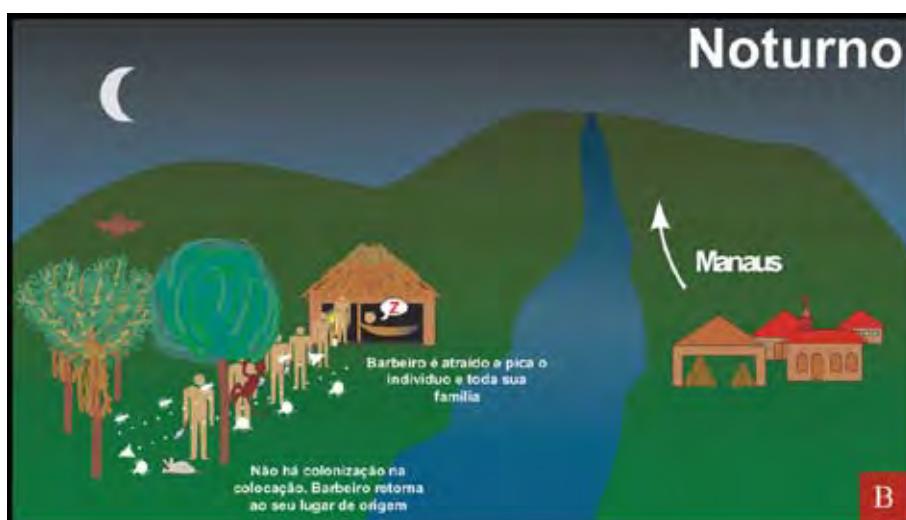
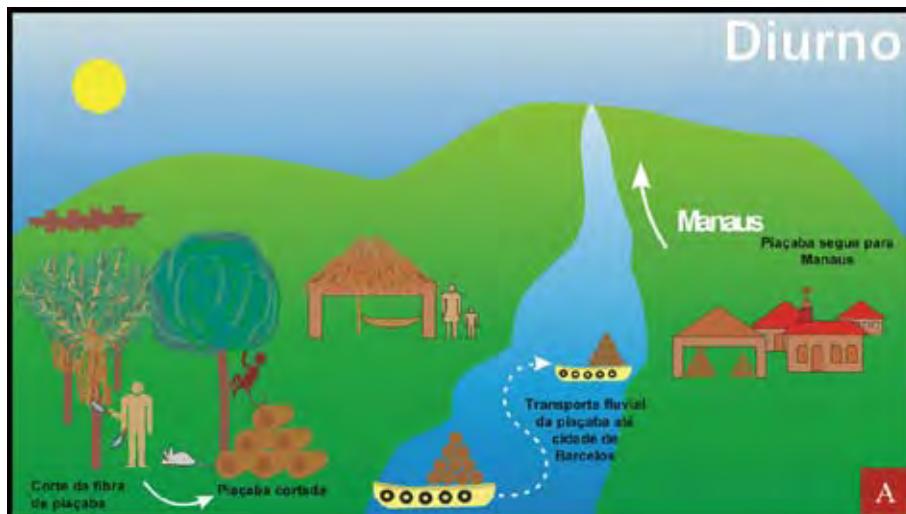


Figura 13: Ciclo biológico do *T. cruzi*, em áreas de extrativismo da Região do Médio e Alto Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil (A, B).

Fonte: JUNQUEIRA, A.C.V. *Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 em áreas do Médio e Alto Rio Negro-Amazonas, Brasil. 2005. 134 p. (tese de doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo.*

3.4 CICLO DE TRANSMISSÃO ORAL

A transmissão por via oral acontece pela ingestão de alimentos contaminados com o parasito. Essa contaminação pode ser natural ou externa. A natural ocorre pela ingestão de carne crua ou mal cozida de animais infectados, ou pelo leite materno (situação esporádica e rara); a contaminação externa ocorre pela deposição de fezes ou urina de triatomíneos sobre o alimento ou mesmo de secreção anal de marsupiais infectados.

Segundo Barreto (1979), esse tipo de transmissão (oral) é usual entre os mamíferos do ciclo silvestre da tripanossomíase americana, que ingerem triatomíneos ou a carne de mamíferos infectados. Com relação ao homem não havia muitos relatos na literatura, porém a partir da última década vários casos têm sido descritos na Amazônia brasileira, grande parte deles atribuídos à ingestão de suco de frutos de palmeiras contaminados com a forma infectante do *T.cruzi*, oriunda de triatomíneos infectados (Tabela 2). Só na Amazônia brasileira já foram descritas 25 espécies de triatomíneos (Aguilar *et al.*, 2007), estando algumas delas representadas na página seguinte (Figura 14).

No ciclo biológico a seguir, está representado o possível modelo de transmissão oral ocorrido no município de Mazagão, no Estado do Amapá, onde foram registrados 17 casos de infecção aguda de doença de Chagas. Valente *et al.* (2009) atribuíram a provável fonte de infecção ao suco de açaí preparado em máquina elétrica, possivelmente contaminada com fezes ou tubo digestivo de triatomíneos infectados (Figura 15).

Em março de 2005, ocorreu um surto da doença em Santa Catarina, onde os dados epidemiológicos, levantados por técnicos do Ministério da Saúde e da Secretaria Estadual de Saúde, indicavam que a única fonte de infecção comum seria a ingestão de caldo de cana contendo formas infectantes do *T. cruzi*. Os trabalhos de campo sugeriram que a contaminação tenha ocorrido durante a moagem da cana-de-açúcar junto com inseto vetor infectado, vindo da mata próxima ao local de processamento do caldo.

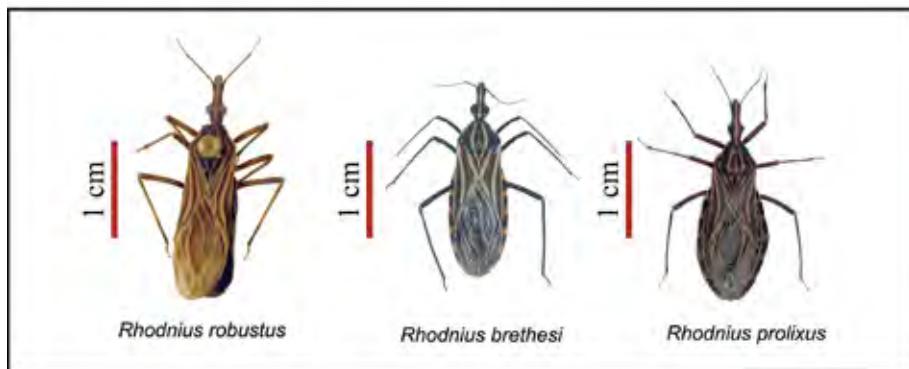
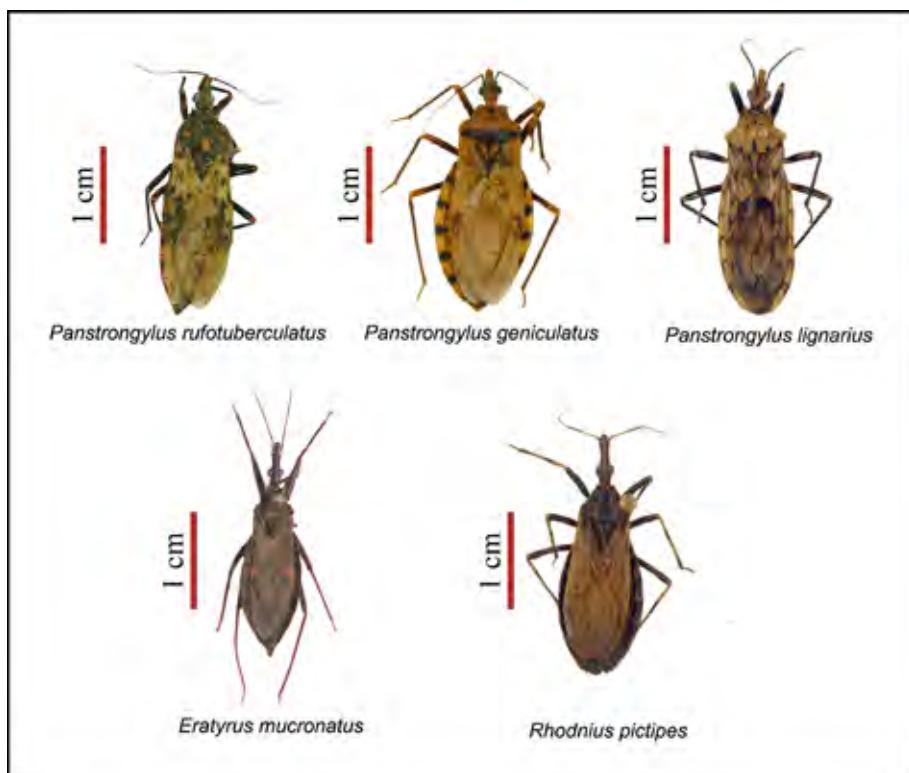


Figura 14: Algumas espécies vetoras da Região Amazônica.

Fotos: Rodrigos Méxas e Marco Aurélio P. da Silva. Layout: Rodrigos Méxas.

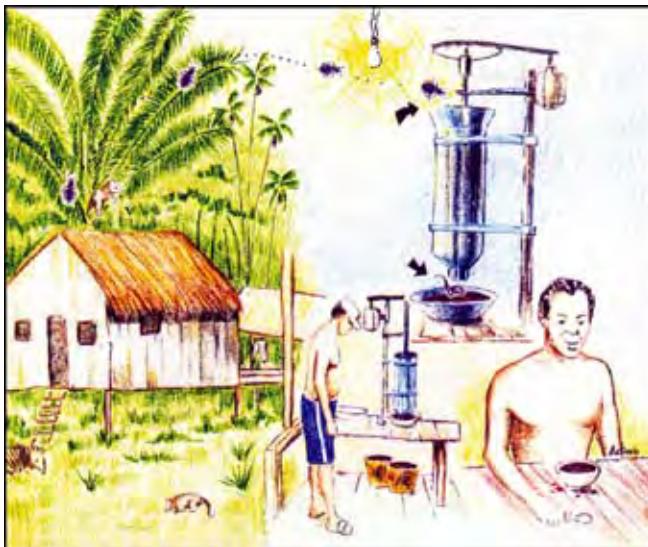


Figura 15: Ciclo biológico do *T. cruzi* em outra área da Região Amazônica.

Fonte: *boletim Informativo sobre vigilância epidemiológica da doença de Chagas*
 FUNASA- Instituto Evandro Chagas.

Tabela 2: Casos de Doença de Chagas Aguda no Brasil de 2007 a 2010.

Região/ UF	2007	2008	2009	2010	TOTAL
Norte	157	124	251	91	626
AP	19	20	15	3	66
PA	109	99	231	59	498
AM	28		3	23	54
AC			2	5	7
TO	1	5			6
RO				1	1
Nordeste	3	7	1	21	32
MA	2	5	1		8
PI	1	1		8	10
CE		1			1
PB				2	2
PE				9	9
SE				2	2
Sul		4	2	6	
PR			4	1	5
RS				1	1
Centro-Oeste	1		5	19	25
MT	1				1
MS			5	3	8
GO				16	16
Brasil	161	131	261	133	666

Fonte: SVS/MS. Dados sujeitos à modificação. Dados atualizados até agosto de 2011.
http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454

4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi*

Segundo Luquetti & Rassi (2000): "... o diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser apoiado pela epidemiologia, pela clínica e confirmado quanto à etiologia, pelo diagnóstico laboratorial que oferece importantes subsídios, desde que realizados com técnicas apropriadas, reagentes adequados e seguindo as boas práticas de laboratório..." Podemos tomar isso como uma norma a ser seguida. Dentro do conhecimento geral do curso da infecção, é imprescindível que fique consolidado o conceito de que a infecção pelo *T. cruzi* no homem apresenta duas fases. A fase inicial ou fase aguda é caracterizada pela relativa facilidade com que se evidencia o parasito no sangue periférico, com manifestações clínicas gerais de porta de entrada do parasito; tais manifestações são características e conduzem à suspeita imediata de uma infecção aguda, e que se confirma com a detecção do parasito no sangue. É importante ressaltar que nem sempre essas manifestações se fazem presentes. Em contraste, na fase seguinte, ou fase crônica, ocorre a diminuição do número de parasitos na corrente sanguínea, sendo por isso difícil seu encontro no exame parasitológico direto. Neste caso, utilizam-se métodos parasitológicos indiretos e de enriquecimento, que demonstram maior sensibilidade que os diretos e que permitem o isolamento do parasita para estudos de identificação e caracterização. Na fase crônica ocorre um período de latência clínica, na maioria dos casos, cujas manifestações podem aparecer anos após a infecção (Prata, 1968; Dias & Macedo, 2005).

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo *T. cruzi* pode ser dividido, didaticamente, em 3 categorias: parasitológicos, moleculares e sorológicos. Alguns autores dividem em apenas dois grupos: parasitológicos e sorológicos.

Os métodos parasitológicos baseiam-se na demonstração do parasito sob a forma de tripanossoma no sangue e outros líquidos orgânicos, ou então sob a forma de leishmania (amastigotas) nos

tecidos. Segundo o procedimento, esses métodos são classificados em diretos e indiretos, conforme mencionado anteriormente.

Recentemente, com o surgimento da tecnologia da PCR (*Polymerase Chain Reaction*), um grande avanço foi conseguido no diagnóstico dos agentes infecciosos. No final da década de 80, vários ensaios surgiram utilizando a PCR na detecção do *T. cruzi*, ficando demonstrada a sua maior sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos clássicos. A PCR consiste na síntese enzimática, *in vitro*, de milhões de cópias de uma sequência específica de DNA do patógeno.

A outra linha de procedimentos adotados é a dos métodos sorológicos, que têm como princípio a ligação antígeno (Ag)-anticorpo (Ac), cuja ligação pode ser revelada por protocolos com fundamentos técnicos distintos.

A grande maioria dos testes utilizados na rotina baseia-se na pesquisa de Acs no soro ou plasma, sendo bem menos usual a detecção de Ags. Seu emprego no diagnóstico da infecção é bem abrangente, o que se deve em grande parte a sua elevada sensibilidade, otimização e custos relativamente baixos em relação aos outros métodos, sendo o método laboratorial de escolha nas triagens de doadores de sangue e inquéritos epidemiológicos.

É fundamental que fique bem compreendido que “*ADCA corresponde ao período inicial da infecção pelo Trypanosoma cruzi em mamíferos, podendo apresentar-se aparente ou inaparente. Define-se basicamente pela alta parasitemia detectável por exames parasitológicos diretos do sangue, tendo duração geralmente efêmera no ser humano (entre três e oito semanas), podendo ser letal em crianças de baixa idade e indivíduos imuno-comprometidos ou evoluir para uma forma crônica de longa duração que se caracteriza por baixíssima parasitemia e um elevado e consistente teor de anticorpos da classe IgG*

” (Figura 16). Desta forma, o método de escolha para o diagnóstico estará condicionado à fase da infecção apresentada pelo indivíduo.

DINÂMICA DA RESPOSTA HUMORAL (IgG) AO PARASITA EM DOENÇA DE CHAGAS ÁGUDA



Figura 16: Curva parasitêmica nas fases aguda e crônica da doença de Chagas.

Fonte: Manual Prático de Subsídeo à Notificação Obrigatória no SINAN, disponível no site http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_chagas.pdf

4.1 EXAMES PARASITOLÓGICOS DIRETOS

Demonstram a presença da infecção através da visualização dos parasitos ao microscópio óptico. Têm alta especificidade e sensibilidade na fase inicial da infecção (casos agudos) e muito baixa sensibilidade nos casos crônicos.

4.1.1 GOTAS DE SANGUE EXAMINADA A FRESCO

Pesquisa direta do parasito na amostra biológica, sem submetê-lo a processos de fixação e coloração. O sangue é colocado entre a lâmina e a lamínula e examinado ao microscópio óptico com o aumento de 400 vezes (400 x). Os parasitos são visualizados pelos seus rápidos movimentos por entre as hemárias, que são por eles deslocadas (Luquetti & Rassi, 2000).

4.1.2 DISTENSÃO FINA E GOTAS ESPESSAS

Como no método anteriormente citado, a técnica baseia-se na pesquisa direta do parasita na amostra clínica, que é submetida a processos de fixação e coloração. O sangue pode ser coletado por punção venosa ou digital, de preferência sem o anticoagulante, que

altera a fixação do material. As técnicas que empregam coloração permitem a caracterização morfológica do *T. cruzi* e a sua diferenciação do *Trypanosoma rangeli*, sendo importante sua utilização onde as duas espécies são encontradas “coabitando”. Nesse exame poderemos encontrar diferentes formas de *T. cruzi* presentes no sangue periférico (Figura 17).

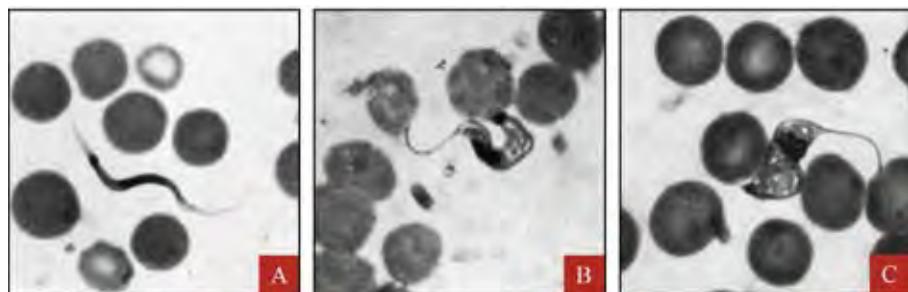


Figura 17: Exemplo de diferentes formas tripomastigotas de *T.cruzi* presentes no sangue de camundongos infectados experimentalmente (polimorfismo):
A) formas finas; B) formas largas; C) formas muito largas.

Fonte: Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 5, p. 220-224, 1963.

4.1.3 MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO DE PARASITAS

São métodos que permitem a investigação direta do parasita na amostra clínica concentrada por centrifugação. Entre os mais empregados na rotina laboratorial estão o **micro-hematórito** (Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda: Manual prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no Sinan- <http://portal.saude.gov.br/saude/>), o **método de pesquisa do parasita no creme leucocitário** (Rey, L. Métodos e técnicas usuais em parasitologia. In: *Parasitologia*. 3^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.788) e o **método de concentração de Strout** (Strout, 1962).

No **MÉTODO DE MICRO-HEMATÓCRITO** examina-se o sangue do paciente com anticoagulante, após centrifugação, em um microtubo capilar.

Para tal, o sangue pode ser coletado inicialmente em tubo coletor com EDTA ou heparina e então transferido, por “capilaridade”, para um microtubo capilar seco. O sangue pode ser também coletado, por punção digital, empregando o próprio microtubo capilar com anticoagulante.

Deve-se preencher, aproximadamente, 2/3 do microtubo por capilaridade. Para isso, inclinar com cuidado o tubo contendo o sangue e introduzir uma das extremidades do microtubo no interior do mesmo; o sangue entrará por capilaridade. Sugerimos encher pelo menos dois microtubos por amostra suspeita.

Após o preenchimento, limpar externamente, com papel absorvente, o lado do microtubo que entrou em contato com o sangue. Após a limpeza, o lado do microtubo que ficará mais distante do centro do rotor da centrífuga deverá ser “vedado/selado” com massa selante apropriada. Durante esse processo, fechar a extremidade oposta do microtubo com o dedo; isso evitará que o sangue escorra na massa durante o procedimento de vedação. A seguir, pressionar uma das extremidades do microtubo na massa selante em movimento de rotação, preenchendo $\pm 0,3 - 0,5$ cm do microtubo com massa.

Depois de vedado, o microtubo deve ser transferido para uma microcentrifuga apropriada e centrifugado por 5 a 10 minutos a 160 g (Figuras 18A e B). Colocar o capilar na centrífuga de microhematócrito com a extremidade vedada para o lado externo. Os microtubos devem estar balanceados, ou seja, um microtubo capilar em posição oposta ao outro. Imediatamente após a centrifugação, o tubo deve ser levado ao microscópio onde examina-se o creme leucocitário (interface entre as camadas de plasma e hemácias), empregando aumento de 100x (Figuras 18 C e D). Outra opção é, com cuidado e utilizando equipamentos de proteção individual para

evitar contaminação accidental, quebrar o microtubo na região próxima ao creme leucocitário e retirá-lo para exame entre lâmina e lamínula com aumento de 400x. Frente a casos suspeitos com exame inicial negativo, o método deve ser repetido em horários diferentes durante alguns dias (WHO Technical Report Series, 1991; Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda: Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no Sinan).

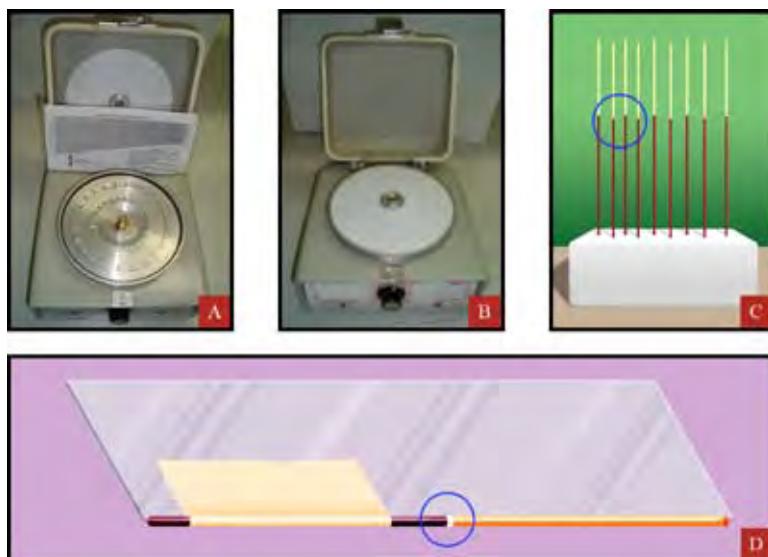


Figura 18: Centrífuga de microhematocrito (A, B), microcapilar após a centrifugação (C), microcapilar montado em lâmina para exame ao microscópio e destaque da área a ser examinada (D).

Fotografias de Carlos José de Carvalho Moreira e desenhos de Bruno Eschenazi.

No **MÉTODO DE STROUT**, coleta-se 5 a 10 ml de sangue sem anticoagulante e faz-se uma dupla centrifugação. Após a primeira centrifugação a 160 g por 3 minutos, o sobrenadante é separado sendo novamente centrifugado a 400 g por 20 min. O sedimento resultante é então examinado entre lâmina e lamínula com aumento de 400x (WHO Technical Report Series, 1991; Secretaria Nacional de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda: Manual prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no Sinan).

Na busca de um protocolo para exame do **CREME LEUCOCITÁRIO**, utilizado na rotina de detecção de *T.cruzi* no sangue, nos foi enviado o empregado pelo Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) do estado do Pará (Email: *lacen@sespa.pa.gov.br*). Nesse protocolo, o sangue (10 ml) é coletado em tubos com anticoagulante e centrifugado a 1500 r.p.m. por 10 minutos (Rey, 2001). Logo após a centrifugação, retira-se, inicialmente, empregando-se uma pipeta, toda a camada superior de plasma, mantendo no tubo a interface fina que contém os glóbulos brancos e a camada de células sanguíneas vermelhas inferior. Após a retirada do plasma, com o auxílio de uma outra pipeta, coleta-se a camada mais clara de glóbulos brancos (creme leucitário ou *buffy coat*), tendo o cuidado para não pipetar junto a camada de células sanguíneas vermelhas. Esse creme leucitário poderá ser diretamente examinado entre lâmina e lamínula com aumento de 400x ou utilizado para a confecção de um ou mais esfregaços que serão desemoglobinizados e fixados. Neste caso, após a fixação, cora-se pelo Giemsa (1ml de água tamponada + 2 gotas de corante) durante 25 minutos. Por último, a lâmina é lavada com água tamponada e deixada para secar na temperatura ambiente. A(s) lâmina(s) corada(s) deverá(ão) ser examinada(s) no microscópio óptico com aumentos de 400x e 1000x (lente de imersão).

O LACEN do estado da Bahia (Email: *lacen.diretoria@bahia.ba.gov.br* ou *lacen.copram@bahia.ba.gov.br*) também utiliza a técnica citada anteriormente, porém, recomenda no caso de resultado negativo (e de disponibilidade de material), transferir o creme e o sobrenadante para outro tubo e centrifugar a 1800-2000 r.p.m. durante 5 minutos. Fazer um novo esfregaço e seguir o mesmo procedimento em relação à coloração e exame microscópico.

Existem também outros métodos, como o **QBC (Quantitative Buffy Coat)** e o **método de concentração em gradiente de Ficoll-Hypaque**.

O **MÉTODO DO QBC** consiste na concentração dos parasitos pela centrifugação do sangue, em tubos de micro-hematórito, combinada com a coloração dos ácidos nucleicos do parasito pelo fluorocromo denominado Laranja de Acridina. É um teste de alto custo por envolver microscopia fluorescente e tubos previamente preparados com anticoagulante e corantes especiais. Em estudo experimental usando a técnica do QBC, Amato Neto e colaboradores (1996) detectaram o *T. cruzi* em camundongos, na fase aguda da infecção, até uma diluição do sangue de 1/10.000. Os equipamentos necessários à realização do exame estão representados a seguir (Figura 19).



Figura 19: Equipamentos e materiais utilizados na Técnica do QBC (A-D).

Fonte: sites www.qbcdiagnostics.com e www.labessentials.com/Lumin_fluorescence_microscopy.htm

O **MÉTODO DE CONCENTRAÇÃO DE FICOLL-HYPAQUE** se baseia na centrifugação de sangue heparinizado (6 ml) em gradiente de Ficoll-Hypaque (3 ml) (Budzko & Kierszenbaum, 1974). Consiste na centrifugação do sangue com anticoagulante a 400 g durante 20 min. Como o Ficoll possui uma densidade maior que a dos linfócitos, porém menor que os glóbulos vermelhos e granulócitos, após a centrifugação os glóbulos vermelhos e os polimorfonucleares passam pelo Ficoll formando um *pellet* no fim do tubo. As células mononucleares ficam na interface entre o plasma e o Ficoll, junto à camada de mononucleares, onde o parasito deverá ser pesquisado (Figura 20).

Os métodos de concentração têm sido empregados com sucesso na suspeita de casos agudos de reativação da infecção (Sartori *et al.*, 1995; Sartori *et al.*, 1998; Galhardo *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2002 e Oliveira *et al.*, 2010).

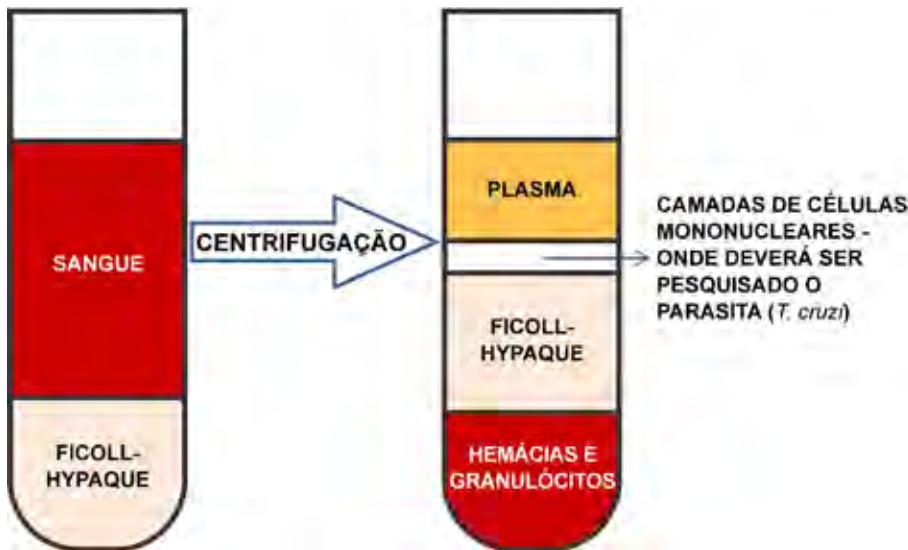


Figura 20: Fundamento do método de concentração de Ficoll-Hypaque.

Esquema de Carlos José de Carvalho Moreira.

4.1.4 INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

4.1.4.1 DETECÇÃO DIRETA DO *T. cruzi* NO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Em pacientes com co-infecção Chagas-HIV e pacientes chagásicos imunocomprometidos por terapia supressiva, que apresentem sinais e sintomas de reagudização da infecção, a pesquisa parasitológica direta de *T. cruzi* não deve se restringir apenas ao sangue periférico, mas ser também realizada no líquido cefalorraquidiano (Figura 21). É importante alertar que, para se obter amostra de líquido cefalorraquidiano, é necessário um profissional qualificado e experiente. Casos agudos, com envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC), também requerem amostras biológicas diferenciadas e a realização de exames complementares de diagnóstico. Uma série de artigos na literatura tem relatado a presença de *T. cruzi* por métodos parasitológicos diretos e indiretos realizados de amostras obtidas por punção medular.

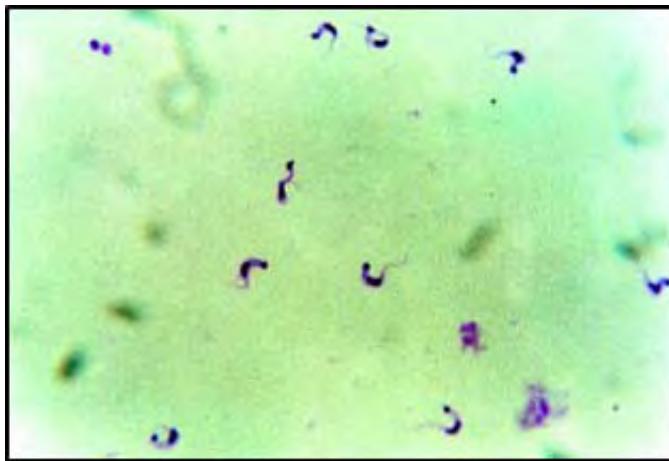


Figura 21: Formas tripomastigotas de *T.cruzi* no fluido cerebroespinhal.

Fonte: Oliveira, L R; Assis, L L T; Maltos, A L; Cali, M C F R; Moraes-Souza, H. *Reativação da doença de Chagas com envolvimento do sistema nervoso central durante tratamento de linfoma não Hodgkin.* Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia. 32(3):269-272; 2010.

4.1.4.2 CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS ATÉ O ENVIO

SORO: 2 a 8°C (geladeira), até 5 dias; -20°C (freezer), até 15 dias.

EXAME PARASITOLÓGICO: as lâminas devem ser enviadas após o esfregaço ou a gota espessa estarem secos. Deverão conter os dados de identificação do paciente. As lâminas não fixadas devem ser enviadas até 24 horas; As fixadas devem ser enviadas até 7 dias após a confecção. Enviar à temperatura ambiente. Para maiores informações consultar o *Manual de coleta, acondicionamento e transporte de material biológico para exames laboratoriais da FUNED*, no link: <http://funed.mg.gov.br/wpcontent/uploads/2011/11/manual_transporte_coleta_2011.pdf>.

4.1.4.3 CONVERSÃO DE g EM r.p.m.

Como as centrífugas mais antigas não permitem fazer a conversão de g em r.p.m. e vice-versa, no próprio equipamento, elaboramos um exercício para que o técnico do laboratório possa fazer essa conversão (Vide páginas 140-142 dos ANEXOS DOS MÓDULOS I E II).

4.2 EXAMES PARASITOLÓGICOS INDIRETOS

Os métodos parasitológicos indiretos, ou de enriquecimento, costumam ser empregados na fase crônica da infecção, onde a pobreza de formas tripomastigotas no sangue periférico torna difícil a demonstração diretamente na amostra biológica. Essa detecção pode ser realizada por 4 métodos indiretos: xenodiagnóstico, hemocultura, xenocultura e inoculação em animais de laboratório.

4.2.1 XENODIAGNÓSTICO (Brumpt, 1914)

Seu resultado depende diretamente da espécie de triatomíneo empregada e do número de ninfas utilizadas (Dias, 1940; Schenone *et al.*, 1969; Cerisola *et al.*, 1974; Borges-Pereira *et al.*, 1996).

Tem sensibilidade de 13% até 50% em indivíduos sorologicamente positivos, na fase crônica da infecção. É empregado como método confirmatório no acompanhamento laboratorial de pacientes chagásicos (Castro *et al.*, 1983) e na avaliação terapêutica na infecção chagásica crônica (Cançado *et al.*, 1969).

O xenodiagnóstico pode ser **direto** (tradicional - *in vivo*) ou **indireto** (artificial - *in vitro*). No xenodiagnóstico direto, 40 exemplares de triatomíneos, de uma determinada espécie, são acondicionados em quatro pequenas caixas de madeira ou de plástico. As caixas são cobertas com filó ou morim (para permitir a alimentação dos insetos) e estes tecidos são fixados com elásticos. Essas caixas devem ser devidamente identificadas com os dados do paciente. Na sequência, as caixas são colocadas diretamente sobre a pele do paciente, para a alimentação dos insetos, conforme a sequência de fotografias a seguir (Figura 22).

No xenodiagnóstico indireto, os triatomíneos ingerem o sangue (coletado com anticoagulante) do hospedeiro vertebrado por meio de uma mamadeira de vidro ou frascos de modelos diversos (Nicolle & Woff, 1943; Rutledge *et al.*, 1964). Os frascos são revestidos com uma fina membrana natural ou artificial que permite o contato da peça bucal do inseto com o sangue contido no mesmo (Figura 23). É importante que este sangue seja mantido aquecido a 37°C para permitir a atração do triatomíneo pelo calor (termotropismo). Como membrana artificial

utiliza-se normalmente um pedaço de preservativo, sem lubrificante, lavado previamente com água destilada e seco. No xenodiagnóstico indireto evita-se a reação alérgica à picada do inseto.

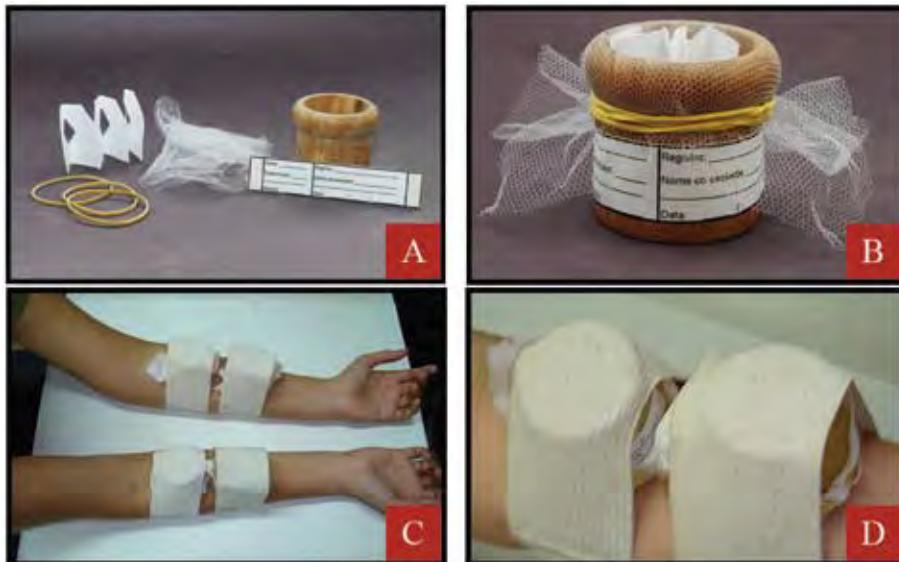


Figura 22: Montagem das caixas para o xenodiagnóstico direto (A, B) e aplicação do xenodiagnóstico direto (C, D).

Fotografias de Rodrigo Méxas (A, B) e Carlos José de C. Moreira (C, D).

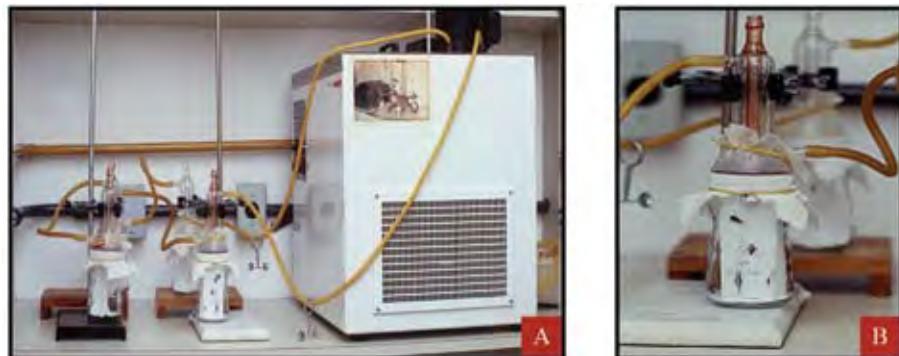


Figura 23: Xenodiagnóstico indireto (A, B).

Fotografias cedidas pelo Dr. Rodolfo A. Devera.

Após a alimentação sanguínea devemos verificar e selecionar apenas as ninfas que se alimentaram (as que apresentam o abdômen distendido, independente do grau de distensão), colocando-as em um recipiente maior. O exame das ninfas deverá ser realizado aos 45 ou 60 dias após a alimentação, de acordo com o procedimento padrão adotado no laboratório. Até a leitura, os insetos poderão ser mantidos a temperatura ambiente. Na metade do período de tempo entre a alimentação e o exame, as ninfas deverão receber uma alimentação suplementar de sangue, que poderá ser feita em galinha (*Gallus gallus*). Esta alimentação é importante para a “manutenção” do *T. cruzi* no inseto.

A técnica utilizada para o exame dos triatomíneos está descrita nas páginas 96/97 do módulo II.

4.2.2 HEMOCULTURA (Chagas, 1909)

É outro procedimento indicado na detecção do *T. cruzi* na fase crônica da infecção. Ele se baseia no cultivo da amostra clínica coletada (sangue, líquor, etc.) contendo o parasito, em meios de cultura enriquecidos. São utilizados aproximadamente 30 ml de sangue centrifugado a 4°C, sendo o sedimento semeado em tubos com meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Os tubos semeados são incubados à temperatura de 28°C, em estufa incubadora de BOD (Chiari & Dias, 1975; Luz *et al.*, 1994). A leitura do exame é feita aos 30, 60, 90 e 120 dias após o cultivo. Aos 120 dias (último exame) é realizada uma centrifugação para exame do sedimento (*pellet*). A sensibilidade desse método é de cerca de 30% até 79% (variável e nem sempre reproduzível). Este método deve ser o escolhido quando se deseja isolar o parasito para estudos bioquímicos, biológicos e moleculares.

4.2.3 XENOCULTURA

A xenocultura (Bronfen *et al.*, 1989) é a semeadura do tubo digestivo ou fezes do triatomíneo em meio LIT. Esse procedimento possibilita o isolamento de cepas de *T. cruzi* e controla a qualidade dos xenodiagnósticos realizados.

Como não representa um acréscimo significativo na positividade dos exames, sugere-se seu uso apenas para controle de qualidade na avaliação dos xenodiagnósticos. Inicialmente faz-se a esterilização externa do triatomíneo em Solução de White, por aproximadamente 1 hora. Posteriormente, retira-se o tubo digestivo do inseto (podendo-se fazer um “pool” de alguns insetos), macera-se o conteúdo e faz-se a semeadura em meio LIT, contendo antibiótico (tudo dentro de uma capela de fluxo laminar). Incuba-se a 28°C e examina-se, pela primeira vez, após 20 dias. O procedimento de retirada do tubo digestivo é o mesmo empregado no xenodiagnóstico direto e indireto.

Solução Esterilizante de White: 0,25 g de HgCl_2
6,50 g de NaCl
25 ml de HCl concentrado
250 ml de Etanol a 5%
750 ml de H_2O

Fonte: Bronfen et al. *Isolamento de amostras do Trypanosoma cruzi por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 84, n. 2, p. 237-240, 1989.

4.2.4 INOCULAÇÃO EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO

A inoculação em animais, dos métodos anteriormente relatados, é o procedimento menos usual, sendo mais utilizado nos estudos de patogenicidade das populações ou clones do *T. cruzi*. Isso se deve à baixa eficácia do método como demonstrado por alguns autores (Freitas, 1947). É importante ressaltar que este tipo de procedimento deverá ser submetido às Comissões de Ética de animais (Figura 24).



Figura 24: Inoculação intraperitoneal em camundongo.

Fotografia de Carlos José de Carvalho Moreira.

5. EMPREGO DOS MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

Esquema prático do procedimento diagnóstico frente a um caso suspeito de Doença de Chagas (Ministério da Saúde do Brasil).

5.1 CASO SUSPEITO DE CHAGAS AGUDO

- Realizar exame a fresco imediato, repetindo 3 a 4 vezes ao dia durante alguns dias;
- Procurar enriquecer a pesquisa, realizando concomitantemente a técnica de micro-hematócrito;
- Se não dispuser de microscópio no local, pode-se colher gota espessa para exame em município vizinho, num esquema similar ao do exame a fresco;
- Colher sangue venoso (ou capilar, em papel de filtro) para realizar imediatamente a pesquisa usual de anticorpos da classe IgG por técnicas convencionais, repetindo este exame 3 semanas após. Uma “viragem” do resultado indicará doença aguda;
- Pesquisar anticorpo anti *T. cruzi* da classe IgM (com restrições).

5.2 CASO SUSPEITO DE CHAGAS CONGÊNITO

- Efetuar a pesquisa direta (ou por micro-hematócrito) do parasito no cordão umbilical ou venoso (criança), repetindo como relatado no quadro anterior;
- Realizar sorologia convencional para pesquisa de IgG anti *T. cruzi* na criança. Repetir a sorologia aos seis ou sete meses de idade a qual, sendo positiva, é sugestiva de doença de Chagas congênita (ou recentemente transmitida por outra via).

OBS: Os procedimentos anteriormente descritos estão no “Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN do Ministério da Saúde”.

Fonte: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_chagas.pdf

6. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Tem como alvo a detecção do DNA (ácido desoxirribonucleico) e o RNA (ácido ribonucleico) do patógeno. Esta estratégia de diagnóstico tem duas grandes vantagens: não depender da imunocompetência do organismo infectado e do tempo de infecção como nos testes sorológicos, bem como só detectar o DNA na presença do patógeno no fluido biológico, pois esta molécula não permanece livre por muito tempo no organismo infectado.

6.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

É um método de síntese enzimática, *in vitro*, que permite a obtenção de milhões de cópias de sequências de DNA. Baseia-se na programação de ciclos repetitivos de desnaturação, hibridação e extensão, conseguidos através de alterações sucessivas de temperatura (Figura 25). A sensibilidade do teste depende, em grande parte, do número de repetições dos segmentos alvos da amplificação (sítios), enquanto que a especificidade depende dos iniciadores (*primers*) empregados. É um método mais sensível do que os métodos parasitológicos clássicos de detecção do *T. cruzi* na fase crônica da infecção.

O método de PCR permite detectar DNA do parasita em diferentes amostras biológicas, tais como:

- 1) sangue total - Avila *et al.* (1991) utilizaram uma solução composta por 6 M Guanidina HCl - 0.2M EDTA, que permitiu estocar o sangue coletado, à temperatura ambiente para posterior análise .
- 2) soro - Russomando *et al.* (1992) conseguiram amplificar o *T. cruzi* em amostras de soro;
- 3) líquor - Lages-Silva *et al.* (2002) comprovaram a existência de DNA de *T. cruzi* no líquor de um paciente chagásico / HIV + ;

- 4) conteúdo fecal/ tubo digestivo de triatomíneos – Valejo *et al.* (1999) conseguiram amplificar *T. cruzi* em amostras de tubo digestivo e hemolinfa de *Rhodnius prolixus*;
- 5) cortes de tecidos - Ghul *et al.* (1997) mostraram ser possível detectar DNA de *T. cruzi* em amostras extraídas de tecido mumificado humano. Vago *et al.* (2000) verificaram, através da técnica de LSSP-PCR (*low-string single primers-polymerase chain reaction*), a variabilidade genética da população de *T. cruzi* presente no tecido cardíaco de 13 pacientes chagásicos e em 5 com megaesôfago. Elias *et al.* (2003) foram capazes, através de uma técnica de micromanipulação, de detectar DNA de *T. cruzi* em um único macrófago dissecado diretamente de uma secção de tecido cardíaco.

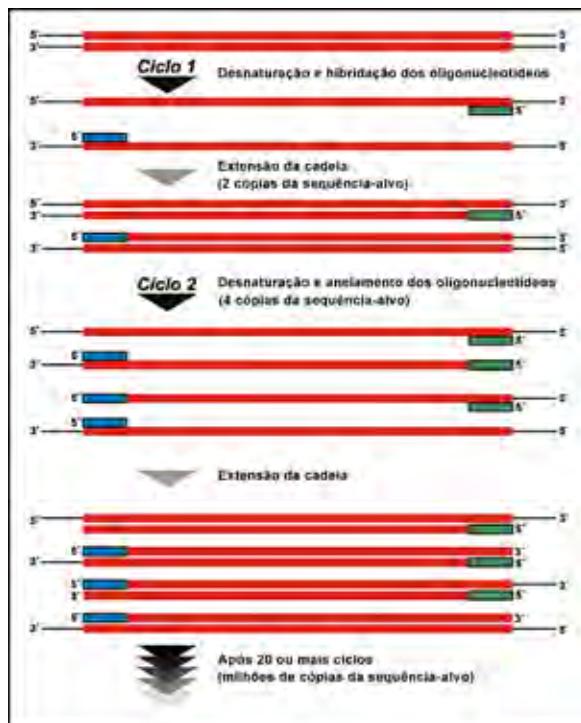


Figura 25: Reação em cadeia de polimerase (PCR).

Figura modificada por Carlos José de C. Moreira e Bruno Eschenazi.

Fonte: www.sci.sdsu.edu/in-vitro-genetics/PCR.gif

6.2 PCR QUALITATIVA

A PCR Qualitativa tem como princípio a amplificação *in vitro* de sequências específicas do material genético (DNA ou RNA) do organismo alvo (Kleppe *et al.*, 1971) e seu resultado baseia-se na visualização do produto amplificado em gel de agarose ou poliacrilamida (presença - PCR positiva ou ausência - PCR negativa), conforme mostra a Figura 26 (A e B). Neste tipo de teste, não se admite resultado inconclusivo.

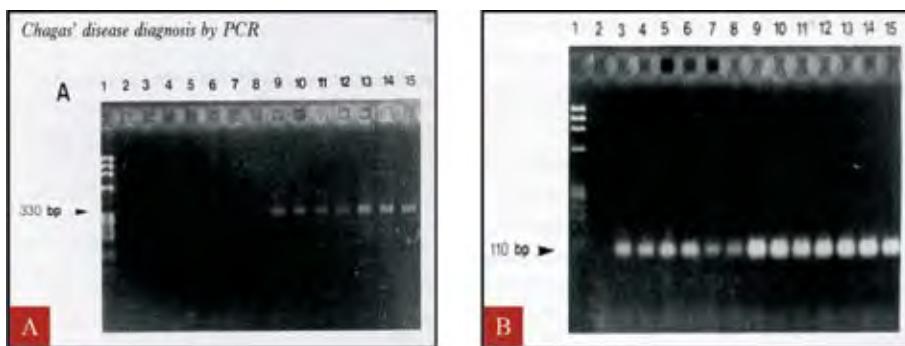


Figura 26: A) Resultado padrão em gel de agarose corado por brometo de etídio, depois da amplificação de DNA extraído das amostras de sangue. A banda de 330 pb presente é representativa da amplificação da sequência específica do minicírculo de kDNA de *T. cruzi*; B) Resultado padrão em gel de agarose corado por brometo de etídio, depois da amplificação do DNA extraído das amostras de sangue. A banda de 110 é representativa da amplificação da seqüência específica do gen de β globina humana (Controle).

Fonte: JUNQUEIRA, A.C.V. Um estudo sobre o xenodiagnóstico, a hemocultura e a reação em cadeia da polimerase na detecção do *Trypanosoma cruzi* 1909 em indivíduos na fase crônica da infecção chagásica. 173 p. (tese de mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, 1996.

O avanço nas técnicas moleculares com o desenvolvimento da PCR qualitativa aprimorou as condições de detecção de patógenos, aliando especificidade e sensibilidade ao diagnóstico (Erlich *et al.*, 1991; Brasileiro Filho & Pena, 1992; Silber *et al.*, 1997). A multiplicação de uma única cópia de DNA em milhões de cópias filhas permite a detecção de agentes etiológicos antes não detectados pelos métodos parasitológicos tradicionais (Breniere *et al.*, 1995; Junqueira *et al.*; 1996; Gomes *et al.*; 1999). Assim, o método tem sido amplamente

utilizado na identificação de agentes etiológicos de diferentes doenças, sendo de escolha quando a quantidade de parasita é escassa. Como exemplo, a identificação de *Trypanosoma cruzi* em chagásicos crônicos caracterizados pela baixa parasitemia, pode ser conseguida através da PCR qualitativa (Batista *et al.*, 2010).

A realização da PCR é precedida por uma etapa de extração do DNA a partir da amostra a ser estudada, que deve ser muito bem executada. Já foi demonstrado que o protocolo de extração de DNA influencia o resultado da PCR. A extração consiste de: a) lise celular para a liberação do DNA da célula; b) remoção de proteínas que podem interferir no processo de amplificação ou que degradam o DNA alvo (DNases); c) precipitação e concentração do DNA extraído. Estes procedimentos podem ser feitos através do uso de métodos *in house*, *kits* comerciais ou preparados comerciais (DNAzol, por exemplo).

Halos *et al.* (2004) publicaram um estudo com carapatos, no qual demonstraram que diferentes protocolos de extração geram diferentes resultados e que a combinação de métodos físicos e químicos é mais eficiente do que o uso de apenas um deles. Em outro estudo sobre extração de DNA em artrópodes (ácaros), Desloire *et al.* (2006) mostraram que podem ocorrer variações na positividade dos resultados de acordo com o estado alimentar do inseto. Em um estudo-piloto experimental utilizando ninfas de 4º estágio de *Rhodnius brethesi* e *Panstrongylus megistus* infectadas com 10, 100 e 1000 *T. cruzi*, foram testados oito diferentes protocolos (Neves 2008, 2010). Com a maioria dos métodos não se obteve sucesso na extração de DNA, enquanto com dois, sim (surgimento de bandas de 330 pares de base, que correspondem ao fragmento de DNA do cinetoplasto do *T. cruzi*). Dos dois protocolos com os quais se conseguiu extrair DNA, apenas um foi considerado o mais adequado por obter DNA a partir de amostras com apenas 10 parasitas. Esses trabalhos são importantes para demonstrar o quanto importante é a etapa de obtenção de DNA, para que a PCR seja confiável.

6.3 PCR QUANTITATIVA

É uma variante da reação de PCR convencional, representando grande avanço nos métodos moleculares de auxílio do diagnóstico, particularmente por facilitar as tarefas de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica.

O princípio do método está baseado na detecção de fluorescência no tubo de reação à medida que o DNA dupla fita é sintetizado, determinando a quantidade de DNA de uma amostra que foi amplificada. Isso é conseguido através de um sistema automatizado que mede a intensidade de emissão fluorescente.

A PCR em Tempo Real torna possível, por exemplo, avaliar a carga parasitária de um paciente chagásico. E tem a grande vantagem de poder diminuir a contaminação da amostra, porém, apresenta um custo mais alto do que a PCR qualitativa.

6.4 ESTUDO COMPARATIVO ENTRE A PCR E OUTROS MÉTODOS DE DETECÇÃO DO *T. cruzi* (xenodiagnóstico, hemocultura e pesquisa em lâmina)

A tabela 3 apresenta os resultados de um estudo que vem sendo efetuado pelo Laboratório de Doenças Parasitárias (antigo Departamento de Medicina Tropical) do IOC-FIOCRUZ na Região do Médio e Alto Rio Negro, Estado do Amazonas, Brasil, comparando o resultado de diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico e uma técnica de diagnóstico molecular em animais silvestres capturados na Região. Vide também a Figura 38 (página 57).

Tabela 3: Comparação entre a PCR e outros Métodos de Detecção do *T. cruzi*.

ANO DE CAPTURA	Nº DE ANIMAIS CAPTURADOS	HEMO	PCR	XENO	LÂMINA
2000	32	1	7	1	1
2001	80	1	12	6	9
2002	82	3	20	14	6

Fonte: JUNQUEIRA, A.C.V. *Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 em áreas do Médio e Alto Rio Negro-Amazonas, Brasil. 2005. 134 p. (tese de doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo.*

6.5 VANTAGENS E DESVANTAGENS DO EMPREGO DA PCR NA DETECÇÃO DO *T. cruzi*

Vantagens:

- 1) Não depender diretamente da imunocompetência do organismo infectado e do tempo* de infecção;
- 2) Possibilitar a avaliação quantitativa da parasitemia;
- 3) Maior sensibilidade em relação aos métodos parasitológicos clássicos;
- 4) Somente detectar DNA na presença do parasita nos fluidos biológicos, visto que esta molécula não permanece muito tempo livre no organismo (Barker,1990).

Obs.: *É importante ressaltar que, apesar da alta sensibilidade, o método de PCR apresenta resultados melhores em maior parasitemia.

Desvantagens:

- 1) Alto custo - todo material é importado e descartável;
- 2) Contaminação com DNA exógeno, que pode ser evitada através de procedimento de “Condições e Condutas Básicas Mínimas”;
- 3) Não reproduzibilidade de alguns protocolos;
- 4) Falta de otimização em se tratando especificamente da detecção de DNA do *T. cruzi*.

7. DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO

Baseia-se na detecção de抗ígenos, anticorpos ou imunocomplexos. A sensibilidade é mais acentuada em relação às provas parasitológicas. A grande maioria dos testes é automatizada, o que determina um baixo custo operacional, rapidez e simplicidade de execução.

No caso da detecção de anticorpos, os níveis irão variar conforme a fase da infecção (Figura 27).

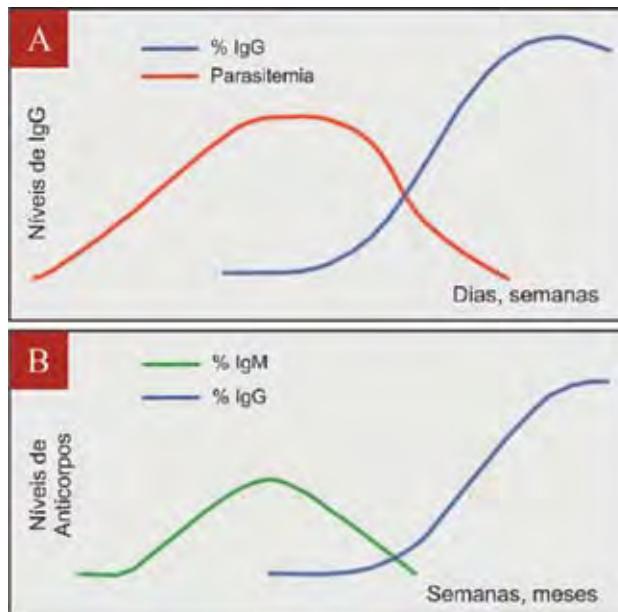


Figura 27: Perfis dos níveis de anticorpos na infecção chagásica (A-B).

Figuras adaptadas e elaboradas por Angela C. V. Junqueira e Carlos José de C. Moreira.

A formação de anticorpos específicos da classe IgM é relativamente precoce, iniciando-se ao término da primeira semana de infecção e mantendo níveis detectáveis durante toda fase aguda. O inverso é verificado com IgG, que começa a ser detectado ao final da fase aguda. Nessa fase é difícil o encontro do parasita no sangue pelos métodos parasitológicos diretos, como pode ser verificado nas curvas de parasitemia feitas em camundongos infectados com diferentes cepas (Figura 28).

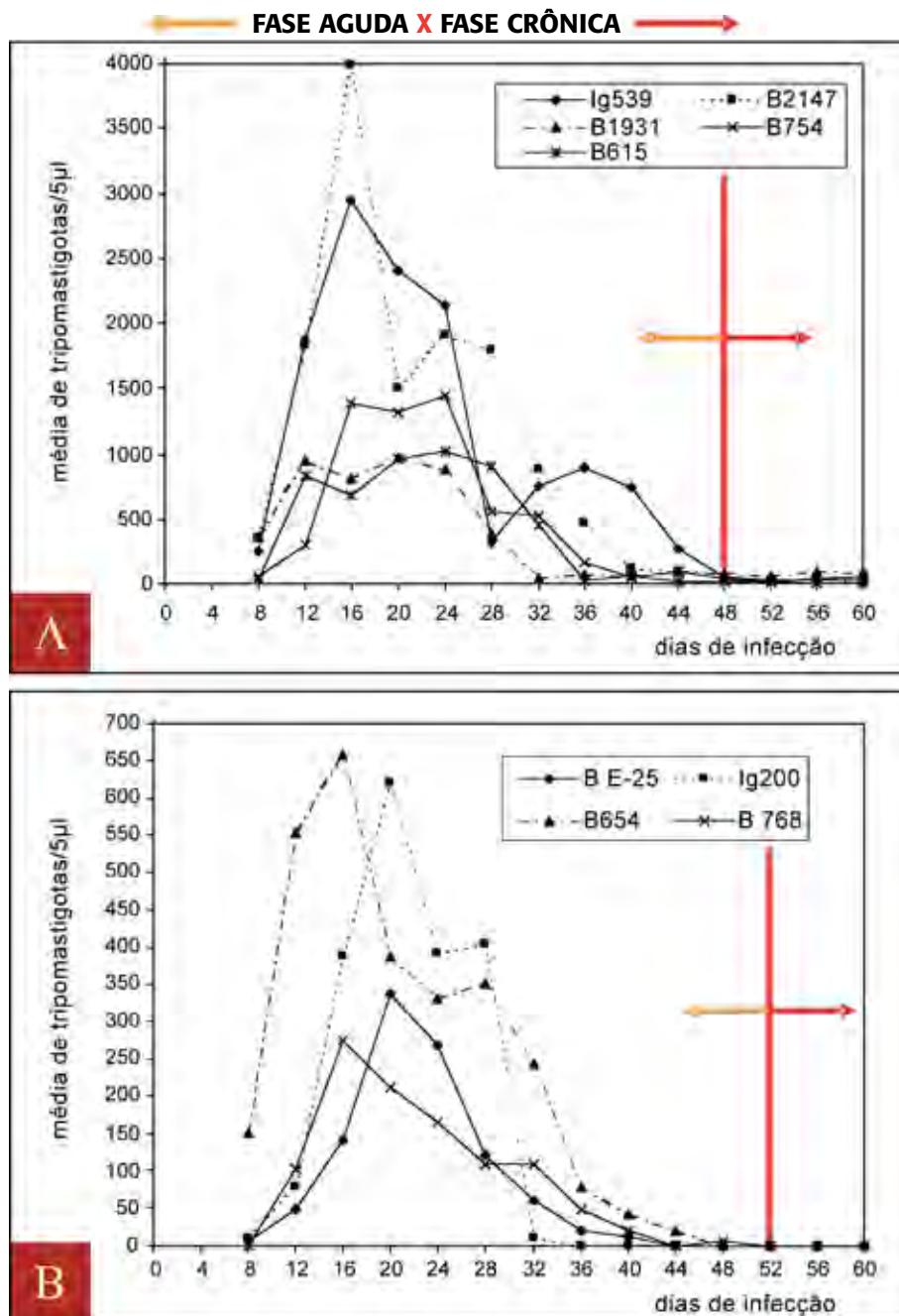


Figura 28: Parasitemia experimental em camundongos nas fases aguda e crônica (A, B).

Figura adaptada por Angela C.V. Junqueira e Carlos José de C. Moreira.

Fonte: DEVERA, R. A. 2002. Caracterização Biológica, Bioquímica e Molecular de Cepas de *Trypanosoma cruzi*, Antes e Após Passagens em Camundongos e em Cultura (Tese) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Rio de Janeiro.

As provas sorológicas podem ser realizadas e utilizadas para:

7.1 DIAGNÓSTICO INDIVIDUAL

- Elucidação de patologias cujos sintomas clínicos não são suficientes para o diagnóstico;
- Diferenciação da fase da enfermidade (investigação de IgM/ IgG);
- Diagnóstico de infecções congênitas;
- Seleção de doadores de sangue;
- Seleção de doadores e receptores de órgão para transplante;
- Avaliação de terapêutica específica.

7.2 INQUÉRITOS SOROEPIDEMIOLÓGICOS

- Estabelecimento da prevalência da infecção. Ex.: 1º inquérito nacional nos anos 70 no Brasil;
- Avaliação dos programas de controle através do monitoramento de novos casos. Ex.: 2º inquérito nacional em menores de 5 anos de idade, em fase de publicação dos dados/Brasil.

7.3 AVALIAÇÃO DAS PROVAS SOROLÓGICAS

A avaliação das provas sorológicas independe da prevalência da enfermidade. Devemos levar em consideração os seguintes fatores:

- 1) Sensibilidade da prova - é a capacidade de um exame se apresentar positivo quando o paciente é realmente portador da doença que se investiga ($VP/VP+FN$);
- 2) Especificidade - é a capacidade de um exame dar negativo quando o paciente não está doente ($VN/VN+FP$);
- 3) Eficiência - quando se tem concordância dos resultados de indivíduos verdadeiros positivos e verdadeiros negativos com indivíduos com e sem infecção, na população estudada ($(VP+VN)/(VP+VN+FP+FN)$);

- 4) Reprodutibilidade - é a capacidade de obtenção de resultados com valores muito próximos entre si, quando se testa uma mesma amostra em diferentes ensaios (R);
- 5) Valor preditivo positivo - é a capacidade de um exame positivo representar um paciente verdadeiramente portador da doença pesquisada (VP);
- 6) Valor preditivo negativo - é a capacidade de um exame negativo representar um paciente sadio (VN);
- 7) Ponto de corte (“cut off”) - o ponto de corte de um teste sorológico é o valor que define o limite entre um teste positivo e um negativo. A escolha deste limiar leva em consideração as frequências dos resultados observados nos testes de uma população em geral, bem como os de especificidade e de sensibilidade de um teste (Figura 29).

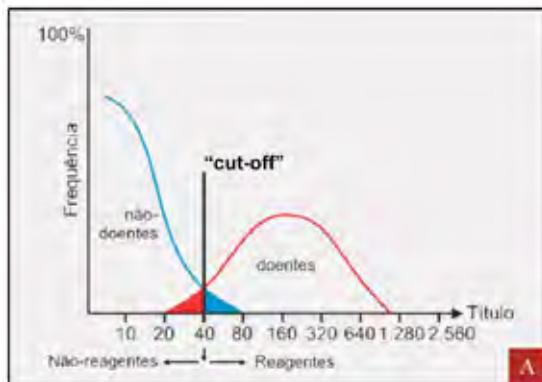


Figura 29: “Cut-off” (A, B).

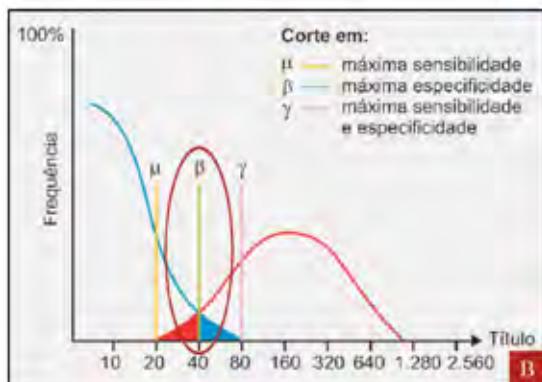


Figura adaptada por Bruno Eschenazi.
 Fonte: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico de Laboratório das principais doenças infecciosas, parasitárias e autoimunes. Correlação Clínico-Laboratorial.* 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

7.4 PROVAS/TESTES MAIS UTILIZADOS ATUALMENTE

7.4.1 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA-IFI (Fife & Muschel, 1959; Camargo, 1966)

Baseia-se na marcação de anticorpos com corantes fluorescentes e visualização ao microscópio de fluorescência com luz ultravioleta (Figura 30). A leitura é visual (microscópio de fluorescência). Tem alta sensibilidade, sendo mais indicado para a fase aguda da infecção (anticorpos da classe IgM após a 1^a semana). Pode apresentar reatividade cruzada com outros抗ígenos, dando origem a resultados falso-positivos. (Ex.: *Leishmania* spp).

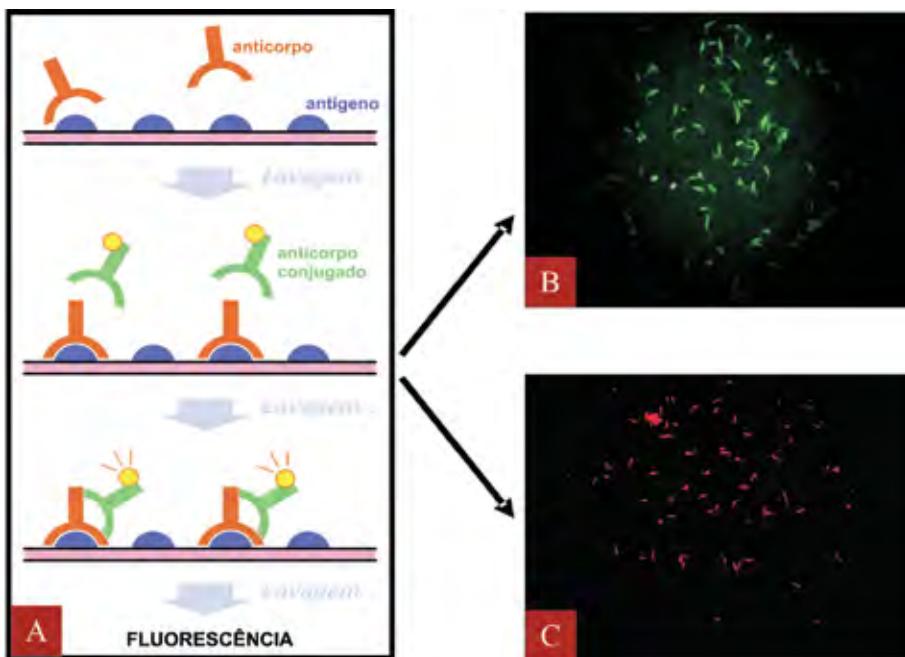


Figura 30: Imunofluorescência indireta: A) princípio do método, B) exemplo de IFI positiva, C) exemplo de IFI negativa, demonstrando, entretanto, autofluorescência.

Figura adaptada por Bruno Eschenazi. Fonte: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico de Laboratório das principais doenças infeciosas, parasitárias e auto-imunes*.

Correlação Clínico-Laboratorial. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
Fotos da IFI de Júlio César Miguel- Laboratório de Doenças Parasitárias- IOC/FIOCRUZ.

7.4.2 HEMAGLUTINAÇÃO INDIRETA (Knierim, 1970; Camargo, 1971)

Baseia-se na sensibilização de superfície dos eritrócitos com a adsorção de抗ígenos e na reação de anticorpos dirigidos contra estes抗ígenos. A reação抗ígeno-anticorpo provoca a aglutinação dos eritrócitos (Figura 31). A leitura é visual (Figura 32).

É uma técnica accessível para qualquer laboratório e de simples execução, porém dependendo do *kit* apresenta problemas de reprodutibilidade.

A hemaglutinação indireta também pode apresentar resultado falso positivo. Devido a isso, normalmente, são incluídos nos kits os seguintes reagentes extras: hemácias não sensibilizadas e 2-mercaptop-etanol. O primeiro é empregado devido à suspeita de anticorpos anti-hemácia; neste caso os soros irão aglutinar hemácias não sensibilizadas. O segundo (2-ME) tem como objetivo eliminar anticorpos IgM naturais, que também podem produzir aglutinação das hemácias.

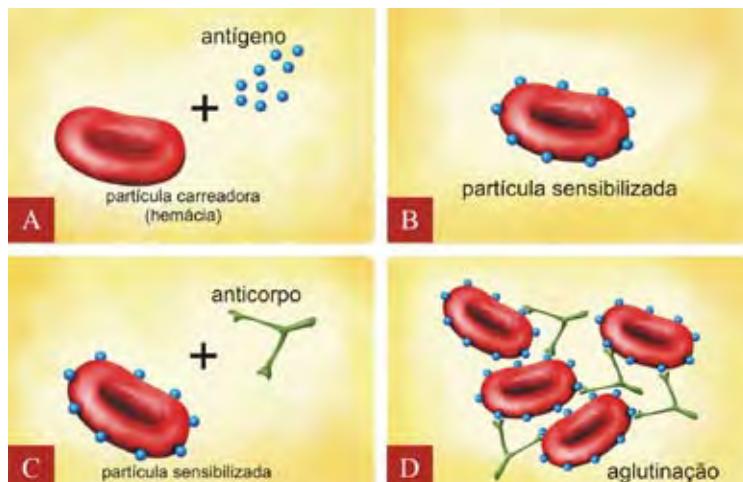


Figura 31: Princípio do Teste de Hemaglutinação Indireta.

Figura adaptada por Bruno Eschenazi. Fonte: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico de Laboratório das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes. Correlação Clínico-Laboratorial*. 2º. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

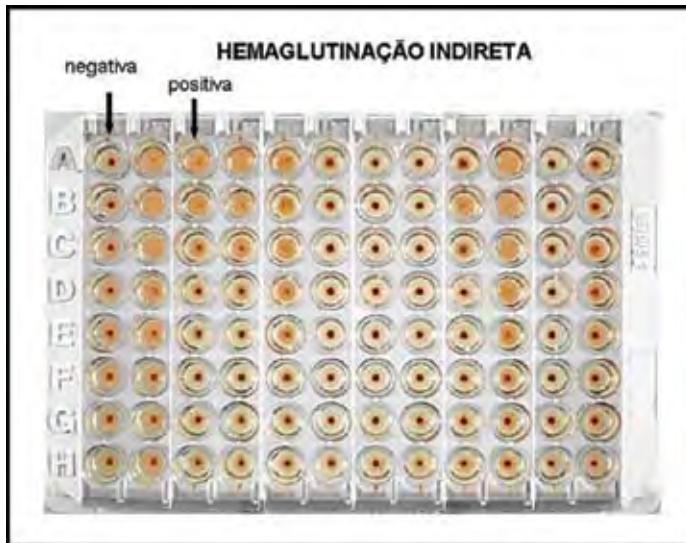


Figura 32: Exemplo de resultado de teste de Hemaglutinação Indireta.

Foto: José Borges Pereira- Lab. Doenças Parasitárias- IOC/ FIOCRUZ

7.4.3 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA (Voller *et al.*, 1976)

Baseia-se na sensibilização de microplacas (ou pérolas) com抗ígenos específicos e incubação com anticorpos frente a um substrato. Um substrato específico para um conjugado marcado enzimaticamente com peroxidase (ou fosfatase alcalina), revela a reação. A leitura é feita com auxílio de um leitor de ELISA (espectrofotômetro automatizado) que “mede” a intensidade da cor obtida em cada poço. A intensidade de cor da reação é diretamente proporcional à quantidade de anticorpos presentes na amostra (Figura 33).

Esta técnica, que permite a realização de várias amostras de maneira simultânea, em um curto período de tempo, pode ter sua especificidade e sensibilidade aumentada ou diminuída, dependendo do Ag que é utilizado para sensibilizar a placa (Umezawa & Silveira, 1999). É um dos métodos mais empregados no diagnóstico sorológico da infecção chagásica.

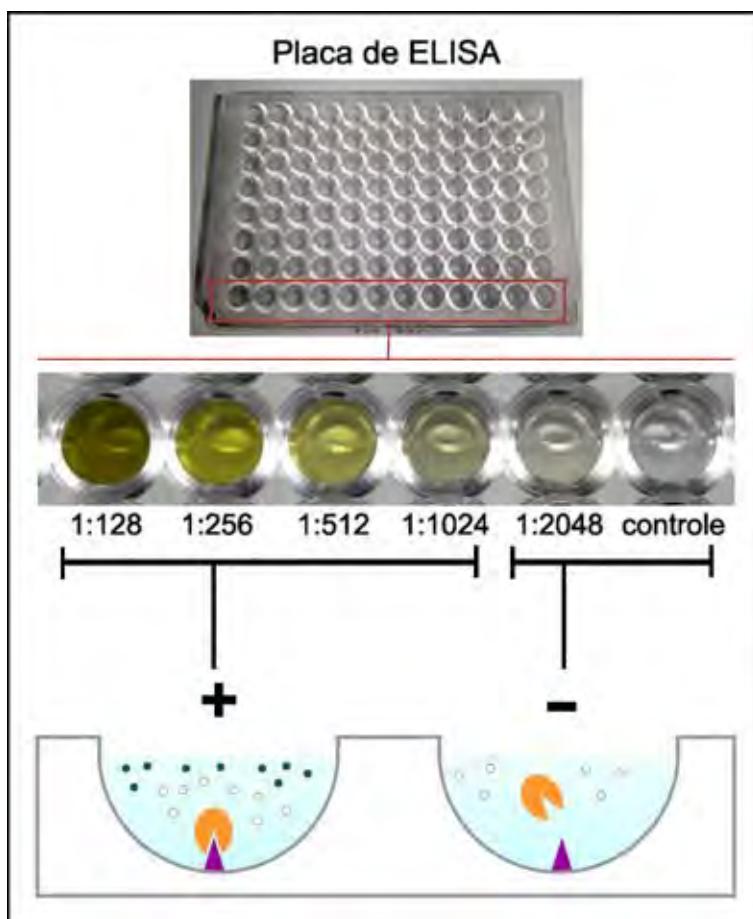


Figura 33: Teste Imunoenzimático-ELISA

Figura adaptada por Angela C. V. Junqueira, Carlos José de C. Moreira e Bruno Eschenazi.
Fonte: FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S. L. M. Diagnóstico de Laboratório
das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes.
Correlação Clínico-Laboratorial. 2º. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

7.4.4 WESTERN BLOT

Um extrato de抗ígenos é separado por eletroforese e transferido para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, a membrana é cortada em tiras pequenas e a seguir posta em contato com o soro a ser testado. Após a incubação, a reação é revelada e a visualização de banda (específica) indica reação positiva (Figura 34). A leitura é visual.

O procedimento técnico é laborioso e de custo elevado, por isso é mais utilizado como teste confirmatório, quando os testes convencionais são divergentes (no caso da suspeita de infecção chagásica).

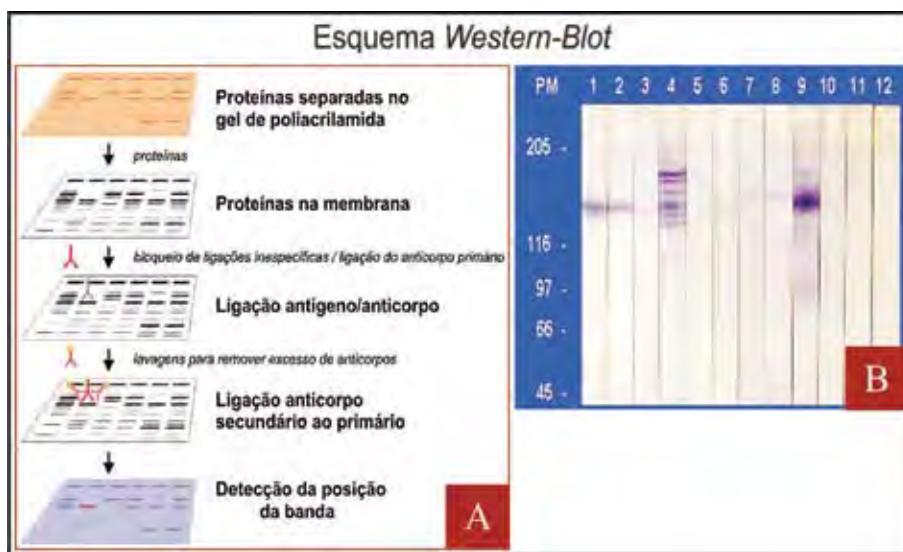


Figura 34: Princípio da reação de Western-blot (A) e resultado de tese blot (B): 1) soro de alta reatividade; 2) soro de média reatividade; 3) soro de baixa reactividade (sorologia convencional positiva); 4) soro padrão SAPA; 5) soro sem reatividade; 6) soro de baixa reatividade (sorologia convencional negativa); 7) soro com reactividade para banda de peso molecular superior a 160 kDa (1^a coleta); 8) soro com reatividade para banda de peso molecular superior a 160 kDa (2^a coleta, depois de 9 meses); 9) soro de paciente chagásico; 10) soro de baixíssima reactividade; 11) soro de indivíduo de região com infecção por *T. rangeli*; 12) soro de indivíduo de região com infecção por *T. rangeli*; PM - marcadores de peso molecular (kDa) estão à esquerda.

Figura A - Adaptada por Bruno Eschenazi e Figura B - Tese doutorado de Junqueira ACV (2005).

7.4.5 TESTES DE EXECUÇÃO SIMPLIFICADA

Os testes rápidos para diagnóstico existentes no mercado têm como principais características a rapidez e a simplicidade na execução, pois normalmente não demandam equipamento ou conhecimento qualificado para a realização do teste ou mesmo interpretação do resultado permitindo a utilização tanto de sangue total, como de plasma ou soro. Seu emprego deve ser destinado a regiões onde o acesso ao diagnóstico é difícil. Alguns deles têm como princípio a imunocromatografia de partículas impregnadas com extratos de *T. cruzi* em membrana de nitrocelulose, que em caso positivo concentra a reação antígeno-anticorpo em uma única fase sólida. Exemplos: Stat-Pak®; Stick Chagas Teste® (SCT).

Entre os atualmente comercializados para doença de Chagas, para ilustrar, podemos citar três deles com fundamentos diferentes:

- IDPaGIA® – é um teste de aglutinação de partículas sensibilizadas com três peptídeos sintéticos. Esses polímeros precipitam na ausência de anticorpos, após centrifugação de suporte apropriado, passando pelo gel e ficando no fundo do “tubo” (reação negativa). No caso da presença de anticorpos anti-*T. cruzi*, os polímeros reagem e são retidos na superfície do gel (reação positiva). Os polímeros são visíveis a olho nu. Apesar da sua execução ser relativamente simples, este teste pode não ser considerado teste rápido, pois necessita de um equipamento especial.
- CHAGAS STAT PACK ASSAY® – é um teste imunocromatográfico, que emprega uma combinação de antígenos recombinantes com alta especificidade contra anticorpos anti-*T. cruzi* (Figura 35).
- IMMUNOCOMB® II – é um teste imunoenzimático, que emprega proteínas recombinantes do *T. cruzi* e anticorpos secundários contra imunoglobulina humana (Figuras 36 e 37).

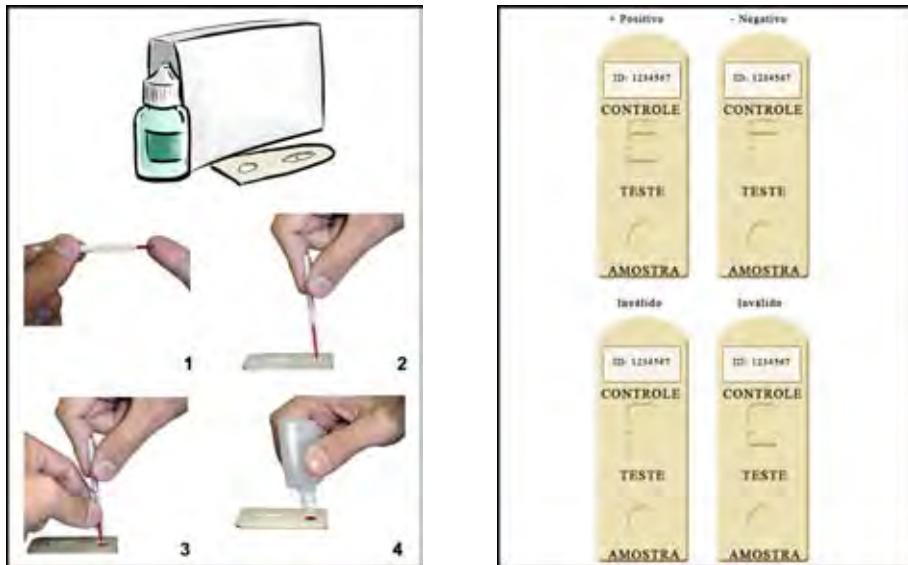


Figura 35: Procedimento e leitura do CHAGAS STAT PACK ASSAY®.

Figuras adaptadas por Bruno Eschenazi.

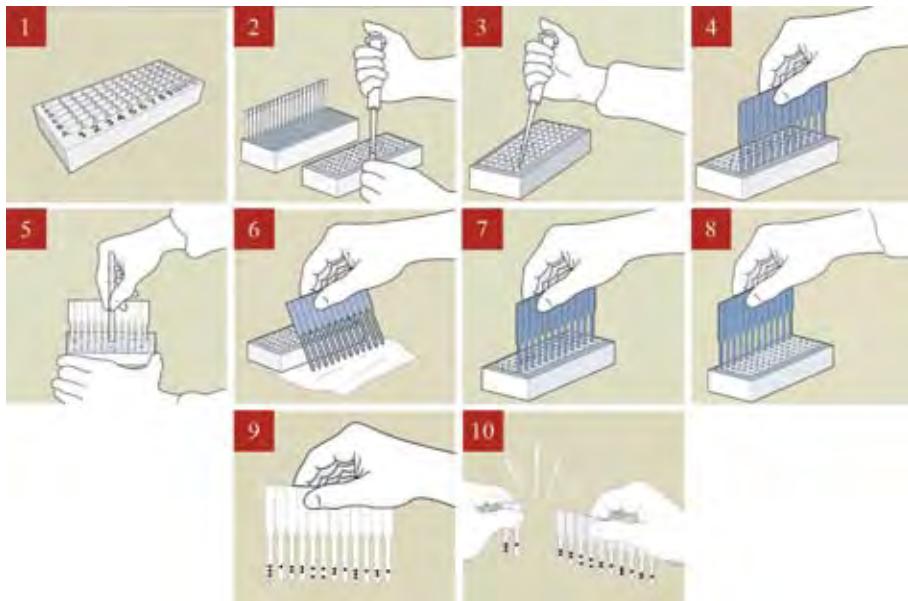


Figura 36: Procedimento do teste IMMUNOCOMB® II

Figuras adaptadas por Bruno Eschenazi.

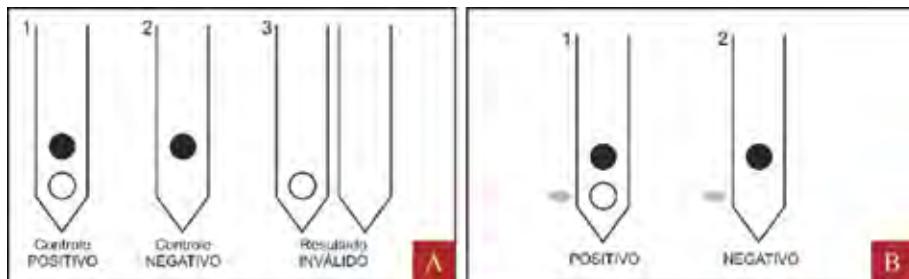


Figura 37: Interpretação de resultado de IMMUNOCOMB® II

Figura adaptada por Bruno Eschenazi.

Testes rápidos para detecção da infecção pelo *T. cruzi* existentes no mercado

1. Chagas AB® - CTK Biotech
2. Chagas Quick Test® - Cypress
3. Chagas Stat-Pak® - Chembio
4. Dipstick Test® - Inbios International Inc.
5. Simple Chagas WB® - Operon
6. Instantest® - Slinanes (Mexico)
7. Serodia-Chagas® - Fujirebio/Japan
8. Immu-Sure Chagas® - Millennium Biotech
9. WL Check Chagas® - Wiener Lab
10. Chagas PaGia® - Diamed
11. SD-Bioline Chagas® - SD-bioline
12. BioSign Chagas® - PBM Co
13. Chagas Double Spot® - Cima Scientific/USA
14. InmunoComb® II - Orgenics (Israel)

*Nota: Todos os 14 testes acima relacionados detectam imunoglobulinas anti-*T. cruzi* no soro ou plasma, porém nem todos foram desenvolvidos para serem usados com sangue total.*

Fonte: "Initial table: C Ponce 2007, updated by MSF and WHO Programme on Control of Chagas disease, in 2011".

7.5 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS SOROLÓGICOS

7.5.1 NA TRIAGEM DE INDIVÍDUOS EM BANCO DE SANGUE

As provas sorológicas têm grande importância para evitarmos a propagação da infecção chagásica através das transfusões de sangue. A transmissão por essa via pode ser devido a alguns fatores como:

- 1) Não realização dos testes;
- 2) Testes realizados de forma inadequada;
- 3) Testes com baixa sensibilidade.

O risco de transmissão do parasita por transfusão de 500 ml de sangue total oscila entre 12 e 20%. O *T. cruzi* também pode ser transmitido pelo plasma e concentrado de hemácias. A transmissão era mais comum nas transfusões de sangue coletado em doadores pagos e nas transfusões de sangue total (Ref.: OMS, Série de informes técnicos 950, Genebra, 2002).

As provas sorológicas realizadas no Brasil de acordo com o RDC 153/06/2004 Ministério da Saúde são: a) HIV 1+2 (2 testes); b) Doença de Chagas (ELISA 1 única prova), c) HTLV/II, d) Sífilis, e) Hepatite C e f) Hepatite B (AgHBs e Anti HBc).

As provas empregadas para detecção sorológica da doença de Chagas na Fundação Pró-Sangue de São Paulo (FPS) e no Hemocentro de São Paulo (HSP) são: a) Imunofluorescência (diluição 1/40) até 04/2003, b) Hemaglutinação (diluição 1/20) até 03/2002 e c) ELISA antes de 19/11/93 (Portaria MS 1.376 de 19/11/93 - Obrigatório à realização de 2 testes de princípios diferentes até 12/2002).

Não obstante, apesar das normas estabelecidas pelo Ministério da Saúde do Brasil, para que não ocorra a transmissão transfusional, a implementação de Políticas Nacionais de controle em bancos nem sempre é cumprida de maneira uniforme. Parte disso deve-se ao fato de que, em todo o território nacional, nem sempre se faz uso de métodos sorológicos automatizados com alta sensibilidade e

especificidade, conforme preconizado (Ref. OMS, Série de informes técnicos 905, Genebra 2002).

Como forma de uniformizar o padrão idealizado, recomenda-se que sejam feitos, de forma sistemática, programas externos de controle de qualidade dos testes sorológicos utilizados na rotina.

7.5.2 NA TRIAGEM DE INDIVÍDUOS DE REGIÕES ENDÊMICAS PARA REALIZAÇÃO DOS EXAMES PARASITOLÓGICOS

O gráfico a seguir apresenta o resultado de um estudo, efetuado pela equipe do Depto. de Medicina Tropical do IOC-FIOCRUZ, em uma região endêmica do Estado do Piauí, Brasil, onde foi comparada a sensibilidade de detecção de *T. cruzi* através da PCR, do xenodiagnóstico e da hemocultura, em pacientes sorologicamente positivo (Figura 38).

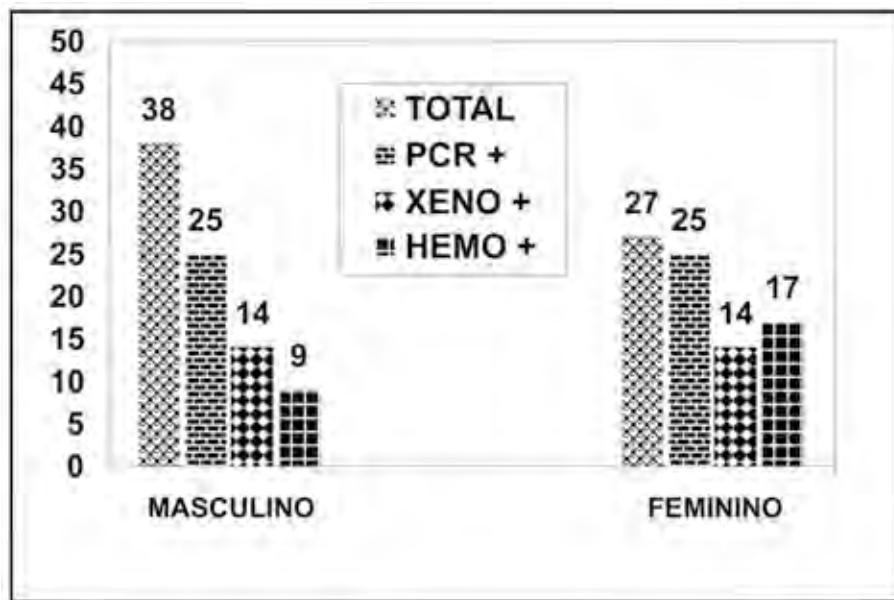


Figura 38: Resultado comparativo de diferentes técnicas de diagnóstico para doença de Chagas.

Fonte: JUNQUEIRA, A.C.V. Um estudo sobre o xenodiagnóstico, a hemocultura e a reação em cadeia da polimerase na detecção do *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909 em indivíduos na fase crônica da infecção chagásica. 1996. 173 p. (tese de mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, 1996.

7.5.3 MODELO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

A maioria das investigações epidemiológicas clássicas de doença de Chagas tem a sorologia como método de triagem inicial. Isso se deve a sua alta sensibilidade, especificidade e custo em relação aos outros métodos de diagnóstico. Abaixo temos um organograma elaborado para a conduta de detecção do *T. cruzi* em humanos (Figura 39).

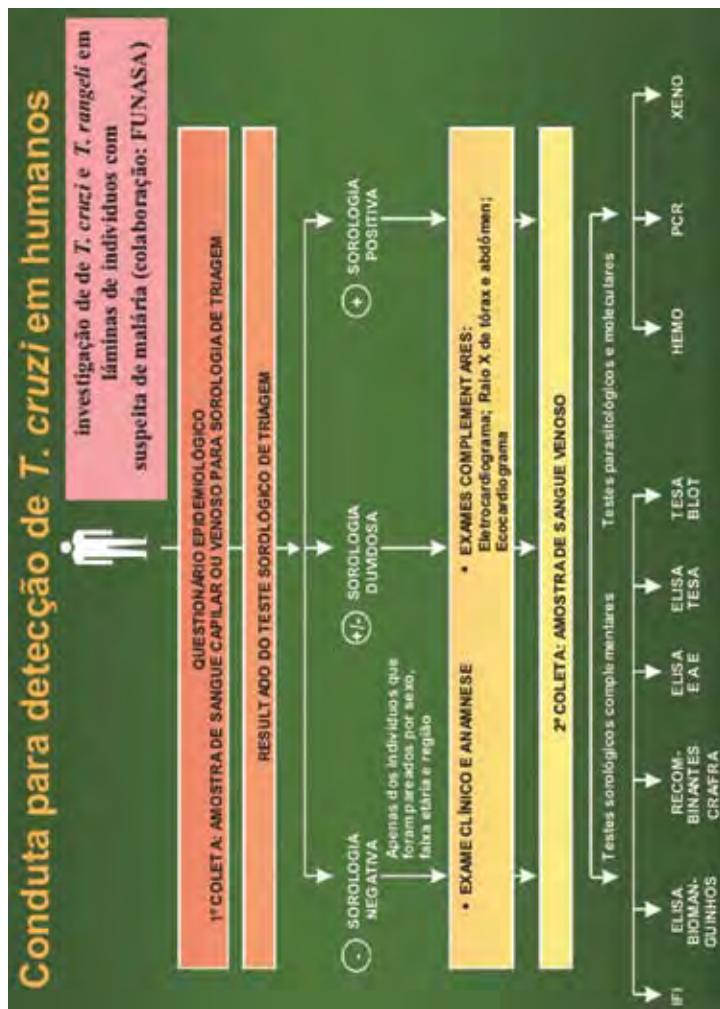


Figura 39: Modelo de organograma empregado em estudo efetuado pelo Depto. de Medicina Tropical do IOC-FIOCRUZ.

Fonte: JUNQUEIRA, A.C.V. *Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 em áreas do Médio e Alto Rio Negro-Amazonas, Brasil. 2005. 134 p. (tese de doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo.*

8. COMPLEXO *Trypanosoma cruzi*

Através de estudos efetuados com isolados de *T. cruzi* de diferentes hospedeiros e regiões endêmicas distintas foi verificado que esta espécie de protozoário é representada por uma população heterogênea. Pode-se dizer que o *T. cruzi* é um complexo formado por populações, muitas vezes bastante heterogêneas, presentes nos diferentes ciclos de transmissão que podem estar sobrepostos ou não (Coura JR *et al.*, 1966). É importante ter o conhecimento que empregamos o termo “cepa” para denominar o isolado obtido de triatomíneos, mamíferos naturalmente infectados ou pacientes. A cepa usualmente consiste de uma população heterogênea de parasitas. Em 1999 foram definidas 2 linhagens principais do *T. cruzi*, denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, visando a padronização da nomenclatura a ser adotada pelos diferentes grupos de pesquisa (Anonymous, 1999). Atualmente, através da utilização de diferentes marcadores moleculares, foi aceita por consenso a subdivisão do táxon *T. cruzi* em seis linhagens ou DTUs (*Discret Taxonomic Units*): *T. cruzi* I a *T. cruzi* VI (Zingales *et al.*, 2009).

A diversidade do *T. cruzi* tem sido verificada empregando-se distintos parâmetros, que vão desde os morfológicos aos moleculares. Para fins didáticos, podemos dividir as diferentes metodologias utilizadas em caracterização biológica, caracterização bioquímica e molecular. Os principais critérios, até a presente data, estão descritos a seguir:

8.1 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA - curva parasitêmica, taxa de mortalidade, morfologia dos parasitas no sangue periférico e estudo histopatológico

No início da década de 70, Andrade *et al.* (1970 a, b) e Andrade, S.G. (1974) iniciaram uma série de estudos visando à caracterização biológica de cepas do *T. cruzi* e seus perfis histopatológicos em animais experimentais. A partir desses estudos foi possível classificar as cepas em três tipos ou biodemias:

Biodesma I (tipo I) - Cepas altamente virulentas, que se multiplicam rapidamente, apresentando elevada parasitemia e mortalidade em camundongos, que morrem entre o 7º e o 12º dias após a inoculação. Apresentam o predomínio de formas delgadas e macrofagotropismo na fase inicial da infecção. Seu protótipo é a cepa Y;

Biodesma II (tipo II) - Cepas com multiplicação relativamente lenta e picos de parasitemia irregulares entre o 12º e 20º dias após a infecção. Apresentam a predominância de formas largas e miocardiocitropismo. Possui como protótipo a cepa São Felipe;

Biodesma III (tipo III) - Cepas que apresentam picos da parasitemia tardios, geralmente entre o 20º e 30º dias após a infecção. Provocam baixas taxas de mortalidade e apresentam o predomínio de formas largas e de baixa multiplicação (~ 50 dias após a infecção). Acometem principalmente a musculatura esquelética. Seu protótipo é a cepa Colombiana. Algumas taxas de parasitemia de cepas de biodesma III estão representadas na figura 40.

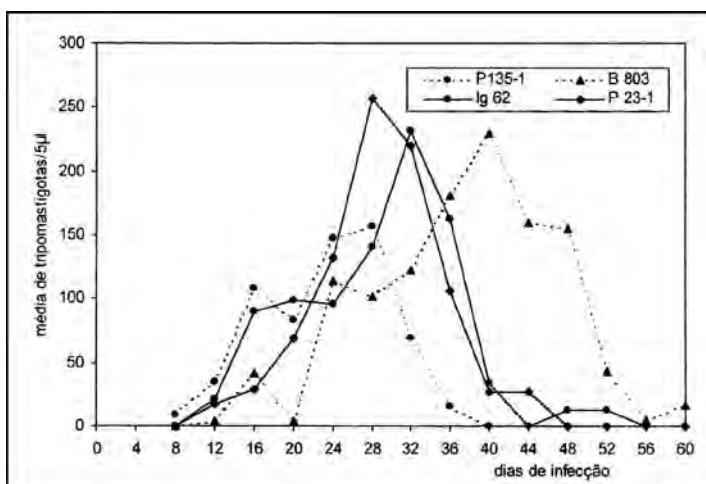


Figura 40: Taxas de parasitemia em camundongos suíços infectados por cepas do *T. cruzi* classificadas dentro do biodesma III.

Fonte: DEVERA, R.; ILLARRAMENDI, X.; MONTOYA-ARAÚJO, R.; PIRMEZ, C.; FERNANDES, O.; COURA, J. R. Biodemes of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from humans from three endemic areas in Minas Gerais State. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2002, vol.35, n. 4, p. 323-330.

8.2 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA - Eletroforese de isoenzimas

A técnica de eletroforese se isoenzimas para a classificação do *T. cruzi* foi introduzida por Toyé em 1974. Posteriormente, outros pesquisadores iniciaram estudos de genética populacional do *T. cruzi* com cepas oriundas da Bahia e de diferentes regiões do Brasil, quando caracterizaram três grupos principais que foram denominadas zimodemias (Miles *et al.* 1977, 1978, 1980). Podemos concluir que zimodemias são grupos de cepas que apresentam perfis eletroforéticos isoenzimáticos semelhantes. Enzimaticamente foram caracterizados três grupos do *T. cruzi* (Figura 41):

- a) zimodema I**, associado a isolados de marsupiais e triatomíneos silvestres,
- b) zimodema II**, associado a isolados domésticos,
- c) zimodema III**, associado ao ambiente silvestre.



Figura 41: Perfis Eletroforéticos de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*.
Enzimas: A) PGM; B) GPI e C) ALAT.

Cepas: PER - Peruana (tipo I); 21 SF - São Felipe e WSL - Wild São Lourenço (tipos II) e COL – Colombiana (tipo III).

Fonte: GOMES, Yara de Miranda *et al.* . Caracterização de uma cepa de *Trypanosoma cruzi* isolada de uma zona não endêmica no Nordeste do Brasil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, São Paulo, v. 37, n. 1, 1995. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46651995000100014&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 29 Jan 2008. doi: 10.1590/S0036-46651995000100014

8.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR UTILIZANDO DNA DO CINETOPLASTO(kDNA)- Análise do Polimorfismo de Tamanhos dos Fragmentos de Restrição do kDNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP*)

No final da década de 70, Mattei *et al.* (1977) introduziram a técnica de classificação de tripanossomos pela análise do polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição do kDNA (*Restriction Fragment Length Polymorphism- RFLP*). Nesta técnica, normalmente um segmento do genoma é amplificado e clivado por endonucleases de restrição. O produto da clivagem é separado por eletroforese e as variações dos tamanhos das bandas, assim como as repetições, constituem os chamados perfis de RFLP.

Posteriormente, Morel *et al.* (1980) empregaram a técnica para a caracterização genotípica do *T. cruzi* e propuseram o termo esquizodema para denominar grupos com perfis semelhantes (Figura 42).

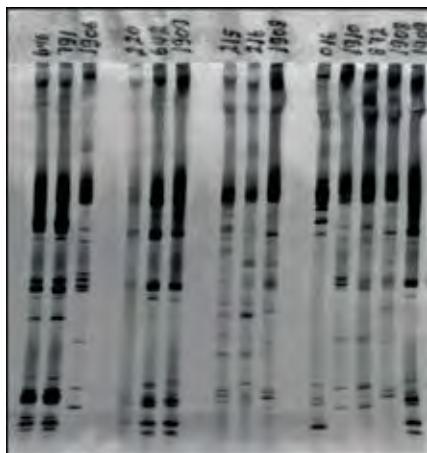


Figura 42: Comparação entre diferentes isolados de *T. cruzi* pelo método de Análise do polimorfismo de tamanhos dos fragmentos de restrição do kDNA.

Montagem de Carlos José de C. Moreira

8.4 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR UTILIZANDO O DNA NUCLEAR

8.4.1 TIPAGEM PELO GENE DE MINI-EXON

O gene que transcrito dá origem ao mini-exon está presente no genoma nuclear dos Kinetoplastida em aproximadamente 200 cópias repetitivas. Este gene é constituído por 3 regiões: o exon, o intron e

a região intergênica. O exon é uma sequência de 39 nucleotídeos altamente conservada, sendo adicionado pós-transcricionalmente a todos os RNAs mensageiros nucleares, atuando no processo de trans-splicing da parasita. O intron é moderadamente conservado entre as espécies de um mesmo gênero ou subgênero. A região intergênica do *T. cruzi* pode ser amplificada por PCR, possibilitando a classificação em dois grupos principais *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Figura 43).

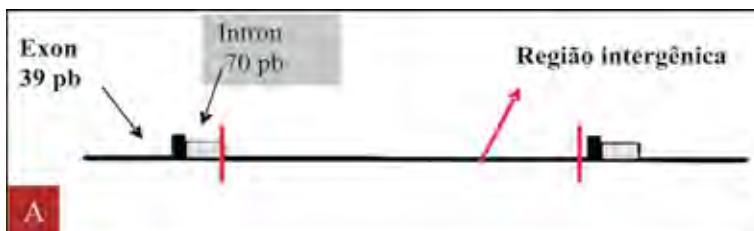


Figura 43A: Representação esquemática do ensaio de PCR para tipagem de *T. cruzi* empregando o gene de mini-exon. A caixa preta representa o mini-exon de 39 bp, a caixa cinza representa a sequência do intron (70 bp) e linha espessa limitado pelos traços vermelhos representa a região intergênica (484 bp).

Figura adaptada por Carlos José de Carvalho Moreira.

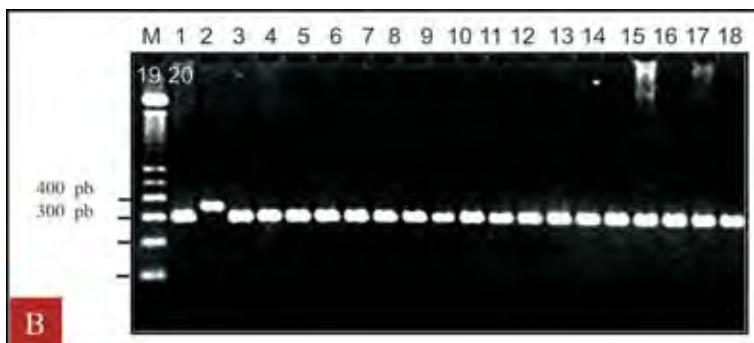


Figura 43B: Gel de agarose corado com brometo de etídio de produtos de PCR para o gene de mini-exon. As cepas são as seguintes: linhas 1 e 2, cepas de referência Y e F (*T. cruzi* II e I, respectivamente); linhas 3-18, cepas testadas.

Fonte: DEVERA, R. A. 2002. *Caracterização Biológica, Bioquímica e Molecular de Cepas do Trypanosoma cruzi, Antes e Após Passagens em Camundongos e em Cultura* (Tese), Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Rio de Janeiro.

8.4.2 TIPAGEM PELO DNA POLIMÓRFICO AMPLIFICADO ALEATORIAMENTE (*Randomly Amplified polymorphic DNA - RAPD*)

Esta técnica tem sido utilizada para estudos taxonômicos e de caracterização de micro-organismos desde a sua introdução por Welsh e McClelland e Willians *et al.* em 1990. Basicamente é uma reação de PCR que utiliza pequenos *primers* de sequências aleatórias capazes de amplificar regiões anômicas do DNA nuclear. O produto da amplificação, quando analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida, demonstra padrões de bandas específicas para cada isolado de um determinado agente infeccioso (Figura 44).

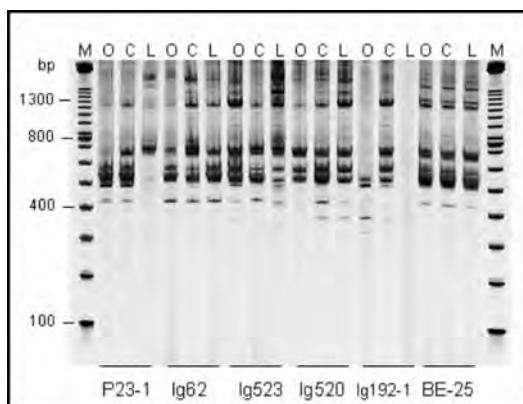


Figura 44: Perfis de RAPD de cepas de *T. cruzi* originais (O), após manutenção em camundongo (C) e meio LIT (L). A. Iniciador 2. B. Iniciador 4. M, marcador de Peso Molecular, 100 bp. Cepas P23-1, Ig62, Ig523-2, Ig 520, Ig192-1, Ig539, BE-25 e B84.

Fonte: DEVERA, R. A. 2002. *Caracterização Biológica, Bioquímica e Molecular de Cepas do Trypanosoma cruzi, Antes e Após Passagens em Camundongos e em Cultura* (Tese) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, Rio de Janeiro.

Esta técnica é uma ferramenta utilíssima para estudos, tanto em tripanossomatídeos, quanto para outros táxons de protozoários parasitas. Em relação ao *T. cruzi* o RAPD tem sido utilizado para obter marcadores de DNA que permitem estabelecer relações genéticas entre diferentes isolados. Apresenta algumas vantagens como: a) como se trata de uma técnica simples não necessita de

uma informação prévia sobre a sequência do DNA a ser estudado; b) requer pequenas quantidades de DNA para que possa ser realizada; c) pode ser empregado um número limitado de *primers* ou iniciadores. As desvantagens são a baixa reproduzibilidade da técnica e não refletir geneticamente a variabilidade populacional.

8.4.3 TIPAGEM ATRAVÉS DAS REGIÕES INTERGÊNICAS (IRTs) DOS GENES RIBOSSÔMICOS (RFLP- ITS- rDNA)

Os genes que codificam o RNA ribossômico são altamente conservados tendo potencial para a análise filogenética. São encontrados como sequências repetitivas que codificam para uma subunidade maior e para outra menor separadas por regiões que não são transcritas, denominadas de espaçadores não transcritos (NTS - non transcribed spacers). Também apresentam regiões codificantes denominadas de espaçadores internos transcritos (ITS - internal transcribed spacers) que são pequenas sequências de grande variabilidade, flanqueados por segmentos altamente conservados, o que torna possível a confecção de iniciadores para PCR que anelam nessas regiões.

Cupolillo *et al.* (1995) padronizaram uma técnica desenhando iniciadores de PCR que permitiram obter um produto de amplificação correspondente a subunidade 5,8 S e mais os dois ITSs flanqueadores (Figura 45A). Os produtos da PCR são digeridos com enzimas de restrição, e após a eletroforese faz-se a análise fenética (Figura 45B).

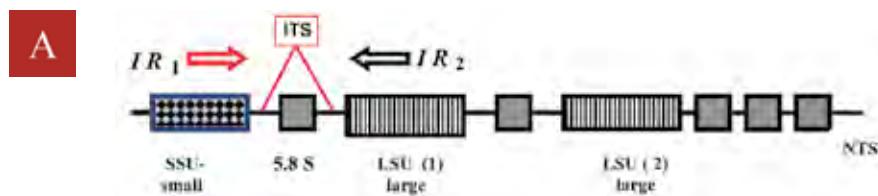


Figura 45A: Locus de um rDNA de Tripanossomatídeo - IR1 e IR2 são os iniciadores da PCR que anelam-se nas regiões codificadoras para as subunidades menor (SSU) e maior (LSU); ITS representa o espaçador interno transcritos e NTS espaçador não transcritos.

Esquema adaptado de Cupolillo, E. et al., 1995. por Carlos José de Carvalho Moreira.

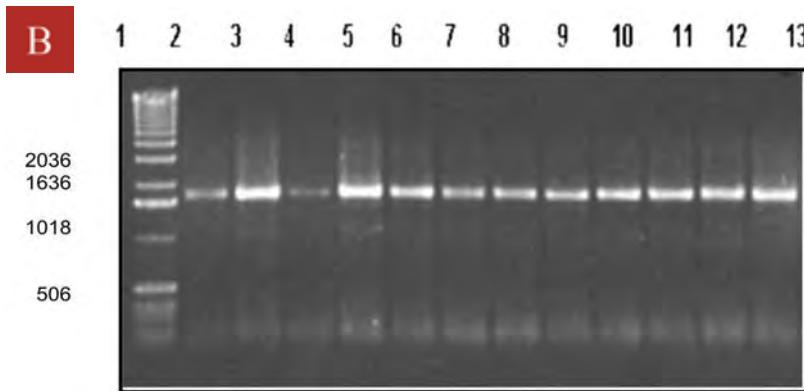


Figura 45B: Eletroforese em gel de agarose 0,8 % mostrando os produtos de PCR corados com brometo de etidio e visualizados sob luz UV. Os produtos correspondem as regiões ITS1 + 5.8S + ITS2 do rDNA do *T. cruzi*: 1) marcador de peso molecular, 1kb; 2) P23orig; 3) P23; 4) P23cam; 5) Ig523orig; 6) Ig523L; 7) Ig523cam; 8) Ig62orig; 9) Ig62L; 10) Ig62cam; 11) B84orig; 12) B84L; 13) B84cam.

Fonte: DEVERA, R. A. 2002. *Caracterização Biológica, Bioquímica e Molecular de Cepas do Trypanosoma cruzi, Antes e Após Passagens em Camundongos e em Cultura* (Tese) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, Rio de Janeiro.

8.4.4 TIPAGEM POR MICROSSATÉLITES

Os microssatélites são uma classe de DNA, que se apresentam de modo repetitivo, em geral em torno de 1 a 6 pares de bases (bp), que estão presentes de forma dispersa no genoma dos eucariotos. Baseados no número de repetições podem ser denominados mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos. O elevado polimorfismo dos microssatélites é resultado da variação no número de repetições, em *tandem*, de um alelo para o outro. Experimentalmente determinou-se que a taxa de mutação dos *loci* de microssatélites que pode variar de 10^{-6} a 10^{-2} . Essa taxa varia segundo o tamanho da repetição. Desta maneira, os microssatélites são considerados marcadores de eleição com aplicações em áreas biomédicas como ecologia, genética de populações e reconstrução filogenética.

A metodologia consiste na amplificação pela PCR, usando um par de iniciadores fluorescentes específicos que flanqueiam o segmento contendo as repetições, analisando-se posteriormente, o tamanho dos fragmentos gerados em sequenciador automático que demonstra os eletrofluorogramas (picos, Figura 46).

Em *T. cruzi* a análise dos microssatélites foi introduzida inicialmente para estudar a estrutura da população do parasita, tentando averiguar se uma determinada cepa era policlonal. Esta técnica também mostrou utilidade como marcador para reconstrução filogenética.

As cepas que apresentam um ou dois picos (um ou dois alelos, correspondendo a diploidia) são consideradas monoclonais. O aparecimento de mais de dois picos nos diferentes *loci* é indicativo da presença de mais de uma população (policlonalidade).

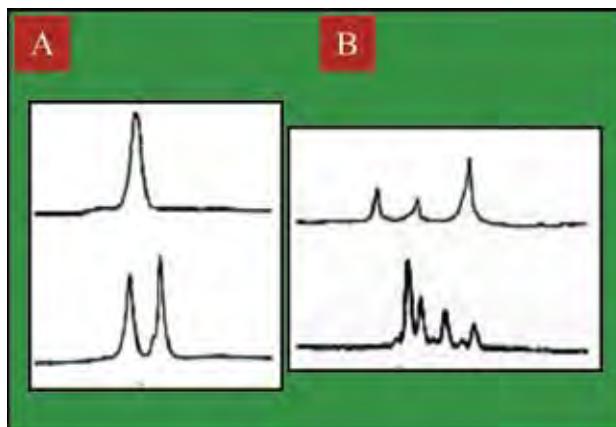


Figura 46: Exemplos de possíveis resultados obtidos num teste de microssatélites para *T. cruzi*. As figuras representam eletrofluorogramas dos produtos da PCR de cepas hipotéticas do *T. cruzi* para um determinado locus de microssatélite: A) Perfil mostrando a amplificação de um pico (cepa monoclonal homozigota) ou dois picos (cepa monoclonal heterozigota); B) Amplificação de três ou quatro picos de cepa multiclonal.

Fonte: DEVERA, R. A. 2002. *Caracterização Biológica, Bioquímica e Molecular de Cepas do Trypanosoma cruzi, Antes e Após Passagens em Camundongos e em Cultura* (Tese) Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Curso de Pós-graduação em Medicina Tropical, Rio de Janeiro.

8.4.5 CLASSIFICAÇÃO ATUAL POR DTUs (DISCRETE TYPING UNIT)

Durante o Simpósio Internacional em comemoração aos 90 anos da descoberta da doença de Chagas, um grupo de pesquisadores se reuniu visando a padronização da nomenclatura do *T. cruzi* (Anonymous, 1999). Ficou estabelecido que as cepas do *T. cruzi* seriam agrupadas em dois principais grupos denominados *T. cruzi* 1 e *T. cruzi* 2. As cepas Tc 1 estariam ligadas ao ciclo de transmissão silvestre e as Tc 2 ao ciclo doméstico, com poucas exceções.

Um novo consenso para definir a nomenclatura específica para o *T. cruzi* foi realizado em 2009 (Zingales *et al.*, 2009) e uma nova classificação foi aceita, baseada em DTUs. Podemos definir DTUs como grupos de cepas que são geneticamente mais relacionados entre si do que com outros grupos, sendo identificáveis por marcadores genéticos, moleculares ou imunológicos. Esta nova classificação levou em consideração o esquema proposto por Lewis *et al.* (2009), utilizando novos marcadores em ensaios triplos:

A) Análise por eletroforese do produto da amplificação pela PCR do gen da subunidade maior do DNA ribossômico (LSU RNA) – a classificação é dada pelo tamanho do fragmento (em pares de bases);

B) Análise por eletroforese do produto resultante da digestão pela enzima de restrição *EcoRV* do gene de HSP60 (60-kDa heat shock protein), amplificado pela PCR (PCR/RFLP-HSP60-EcoRV) - a classificação é dada pelo perfil de bandas gerado;

C) Análise por eletroforese do produto resultante da digestão pela enzima de restrição *HhaI* do gene de GPI (glicose-6-fosfato-isomerase), amplificado pela PCR (PCR/RFLP-HhaI-GPI). Como no caso anterior, a classificação também é dada pelo perfil de bandas gerado (Figura 47).

A Figura 48 demonstra os diferentes genótipos do *T. cruzi* (classificação atual) e sua distribuição geográfica.

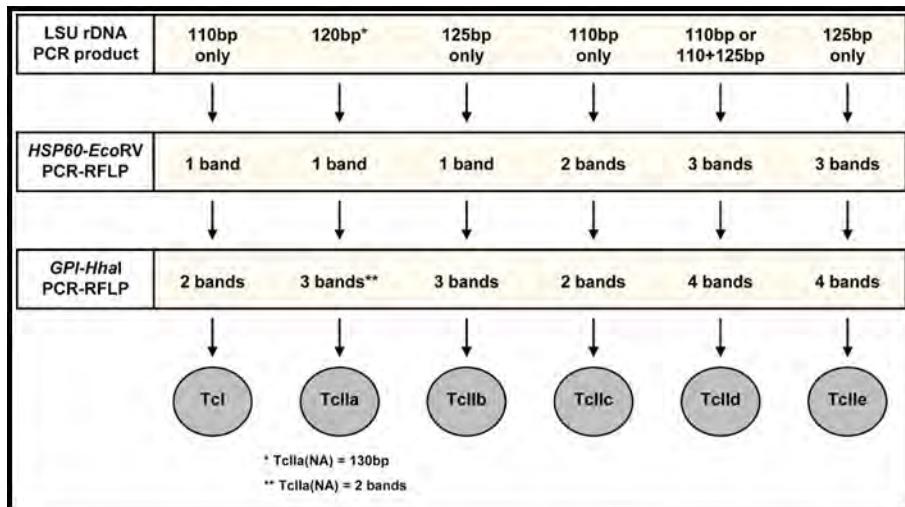


Figura 47: Esquema do triplo ensaio proposto por Lewis *et al.*, 2009.

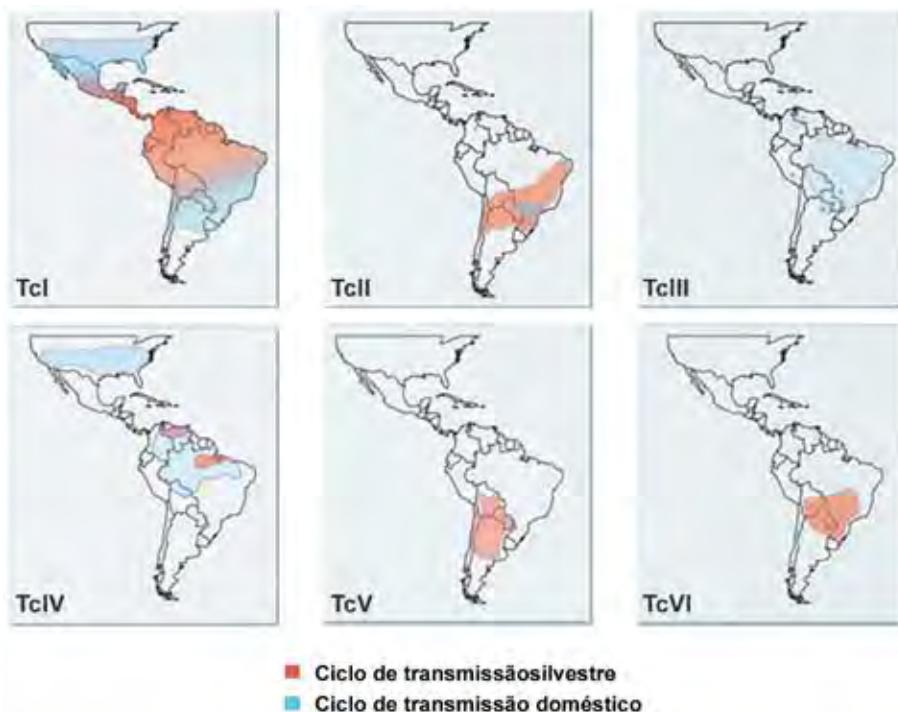


Figura 48: Distribuição geográfica dos 6 genótipos do *T. cruzi*.

Figura adaptada de: WHO, how, what and where? *Nature Outlook*, v. 465, n. 7301, p. 58-59, Jun. 2010.

1. MÉTODOS PARASITOLÓGICOS DIRETOS

1.1 FUNDAMENTO

Conforme relatado anteriormente, os métodos parasitológicos diretos baseiam-se na pesquisa direta do parasita na amostra clínica.

Eles podem ser realizados em laboratórios clínicos com condições mínimas de equipamentos, porém é necessário que o profissional tenha passado por um treinamento de reconhecimento do parasito. Nesse treinamento, o *T. cruzi* deve ser diferenciado de outras espécies de tripanossomas que infectam também o homem.

Nas páginas seguintes nos deteremos em protocolos que se baseiam na demonstração do parasito em lâmina, que são procedimentos simples sendo necessário apenas como equipamento um microscópio. É importante voltar a ressaltar que os métodos parasitológicos diretos só apresentam alta sensibilidade na presença de parasitemia patente, sendo por isso o método de escolha na suspeita de casos agudos ou de reativação da infecção.

1.2 COLETA DA AMOSTRA

A obtenção da amostra de sangue pode ser realizada diretamente por punção digital ou venosa. Vide Figura 21 na página 144 dos Anexos dos Módulos I e II.

2. PROTOCOLOS

2.1 EXAME DE SANGUE A FRESCO

O exame a fresco do sangue é mais sensível que o esfregaço corado e deve ser o método de escolha na suspeita de infecção aguda. Por outro lado, não possibilita uma boa visualização das características morfológicas do parasito, por isso recomenda-se em caso positivo fazer distensões coradas com objetivo de fazer um diagnóstico morfológico diferencial com o *Trypanosoma rangeli*, um outro tripanossoma que também infecta o homem e compartilha vetores comuns com o *T. cruzi*.

No “Consenso Brasileiro em Doença de Chagas”, desenvolvido por especialistas brasileiros, é sugerida a seguinte conduta diagnóstica: “caso os exames diretos sejam negativos, devem ser usados os métodos de concentração, tais como micro-hematórito, teste de Strout ou QBC (Quantitative Buffy Coat). Estes métodos apresentam 80 a 90% de sensibilidade e são recomendados quando houver suspeita de doença de Chagas aguda e o exame direto a fresco resultar negativo”.

2.1.1 PROCEDIMENTO

- 1) Colocar uma pequena gota de sangue, coletada por punção digital ou venosa, no meio da lâmina e cobrir com uma lamínula (20x20 ou 22x22). Se for realizada a contagem de parasitos empregar a lamínula 22x22.
- 2) Levar ao microscópio e fazer a leitura utilizando objetiva de maior poder ampliador (ideal 40X);
- 3) Se negativa, recomenda-se diariamente fazer várias lâminas em coletas periódicas, antes de dar o exame como negativo.

2.2 DISTENSÃO FINA OU ESFREGAÇO

A distensão fina permite a identificação das estruturas morfológicas da espécie alvo de reconhecimento, porém a sensibilidade do diagnóstico é menor que a da gota espessa. Isto ocorre em virtude da menor concentração do sangue. Também proporciona a classificação morfológica do parasita por permitir uma melhor visualização dele. Entretanto, a gota espessa, por ter uma maior quantidade de sangue desemoglobinizado, apresenta uma maior probabilidade de se visualizar o parasito na amostra.

Para a confecção da distensão fina devemos utilizar uma lâmina biselada ou escantonada para espalhar o sangue, trabalhando em uma superfície plana horizontal. Devemos formar um ângulo de aproximadamente 45° com a lâmina biselada e, logo após a mesma entrar em contato com a gota de sangue, espalhá-la com um rápido movimento para frente, para formar uma camada fina, sem atingir o final da lâmina. Mais detalhes da confecção serão fornecidos a seguir. A distensão fina “deveria permitir”

uma menor perda de parasitas, se comparada com a gota espessa, por ser fixada e não ser submetida à desemoglobinização (Figura 1). As distensões finas conservam por maior tempo a coloração original e resistem mais ao atrito após a remoção do óleo de imersão.

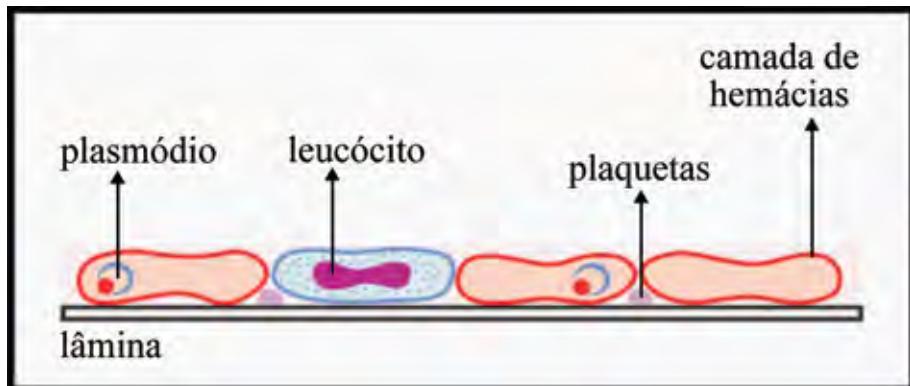


Figura 1: Secção de esfregaço. Desenho adaptado por Heloísa Maria Nogueira Diniz.

Fonte: PRAT, J.G.; TRAID, M.C.; MORAIS, P.; ANDRADE, S.L. (orgs) *Combatendo a Malária no Parque Nacional do Jaú e Resex do Rio Unini. Barcelona: Nucli d'estudis per a l'Amazônia de Catalunya- NeAC, 2009.*

2.2.1 CONFECÇÃO E COLORAÇÃO DAS DISTENSÕES

1^º ETAPA: COLETA DA AMOSTRA E PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

- 1) Colocar uma pequena gota de sangue, coletada por punção digital ou venosa, na extremidade da lâmina. Tocar a gota de sangue com a borda estreita da lâmina sem canto (lâmina extensora), formando um ângulo de 45° com a face superior da lâmina (Figura 2A);
- 2) Fazer com a lâmina extensora um ligeiro movimento para trás, até encostar na gota de sangue. Deixar que a gota se difunda uniformemente, ao longo da borda da lâmina extensora, por capilaridade (Figura 2B);
- 3) Levar a lâmina para frente, de forma que ela carregue a gota de sangue que se quer estender numa camada delgada e uniforme. É essencial escorregar a lâmina extensora de uma só vez, sem deter-se. O movimento de extensão deve ser uniforme. O

sangue deverá ser puxado pela lâmina e não empurrado pela mesma (movimento suave, Figura 2C).

- 4) Deixar secar à temperatura ambiente ou em uma estufa a 28 ° C.

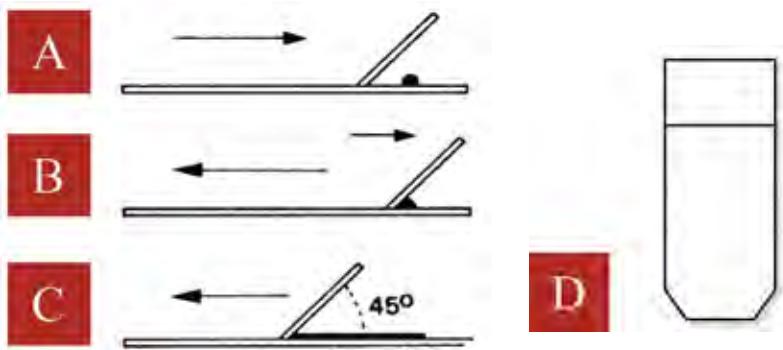


Figura 2: Modo de estender a gota de sangue: A) O ângulo entre a lâmina e a lâmina extensora deve ser de 45 °; B) Aproximando as duas, a gota de sangue se distende por capilaridade imediatamente; C) O sangue é carreado pela borda da lâmina, que se impulsiona para frente em um movimento rápido e leve; D) Detalhe da lâmina extensora (bizedada).

Fonte: BEÇAK, W.; PAULETE, J. Sangue: Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos, 1 v., 1976, 306 p.

2º ETAPA: COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GIEMSA

Neste tipo de coloração descrito, utilizamos o corante Giemsa. A solução de Giemsa destina-se a coloração de esfregaços do sangue ou da medula óssea *in vitro*, consistindo numa solução tampão de tiazina e eosinato concebida para a coloração de elementos figurados do sangue. Esse corante poderá ser utilizado em separado ou em conjunto com o corante May-Grünwald. O Giemsa, que cora especificamente os grupos de fosfato do ADN, liga-se a regiões onde há alta quantidade de ligações A-T (Adenina - Timina).

Em uma coloração bem feita, os núcleos celulares apresentarão diversos tons de púrpura. A coloração citoplasmática apresentará diversos tons de azul a cor-de-rosa claro. As etapas estão descritas a seguir:

- 1) Fixar as lâminas com álcool metílico livre de acetona durante 1 a 2 minutos à temperatura ambiente (pela nossa experiência 1 min é o suficiente);
- 2) Corar as distensões com solução de Giemsa, preparada no momento da coloração na concentração de 1 volume de Giemsa para 9 volumes de água tamponada (pH 6,8) (preparação do corante e da água tamponada em Preparo de Soluções, no item 6);
- 3) Colocar o corante sobre a lâmina ou imergir em frasco de vidro tipo *Coplin* (Figura 3), deixando por cerca de 5 a 10 minutos;
- 4) Lavar a lâmina em água da torneira (fluxo fino);
- 5) Escorrer a água e deixar secar.

Fonte: SIMONS, A. *Technical Hematology*. Philadelphia & Toronto: J.B.Lippincott Company, 1976. 476p.



Figura 3: Frasco de Coplin.

Fotografia de Marcello Pelliccione.

OBS: *O exame da gota distendida deve ser empregado em caso de suspeita de infecção aguda, porém tem pouca sensibilidade no caso dos parasitos não serem abundantes. Tem a vantagem de possibilitar uma boa visualização da morfologia do parasita. É conveniente fazer várias lâminas, antes de dar o caso como negativo. Quanto mais antigo o esfregaço maior o tempo de coloração. Um esfregaço novo, geralmente, requer de 10 a 15 min para se corar.* (Fonte: Beçak, W.; Paulete J. *Sangue: Técnicas de Citologia e Histologia*. Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos, 1 v., 1976, 306 p.).

2.3 GOTA ESPESSA

É um método simples e eficaz de diagnóstico, além de ter baixo custo. A gota espessa é também o método oficialmente utilizado no Brasil, para o diagnóstico da malária. Sua técnica baseia-se na visualização do parasito, através de microscopia ótica, após coloração pelo método de Walker ou Giemsa.

Permite a diferenciação específica dos parasitos a partir da análise de sua coloração, da morfologia e de seus estádios de desenvolvimento no sangue periférico, devido a sua alta concentração. Para a confecção da gota espessa, podemos colocar pequenas gotas de sangue nas posições relativas aos vértices de um quadrado imaginário e uni-las com um movimento circular utilizando um palito descartável ou o vértice de uma lâmina comum (Figura 4).

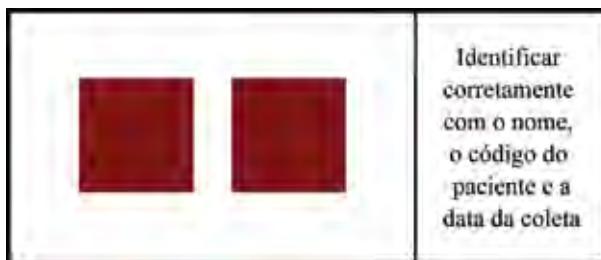


Figura 4: Gota espessa.

Desenho de Carlos José de C. Moreira.

Como dissemos anteriormente, nos procedimentos acima descritos devemos, preferencialmente, utilizar o sangue sem anticoagulante, pois essas substâncias dificultam a fixação do sangue, fazendo com que o esfregaço ou a gota espessa possam desprender-se durante o procedimento de coloração ou durante a lavagem posterior à coloração. O material deve ser corado no máximo até 72 horas após a confecção. No caso da gota espessa, a desemoglobinização fica prejudicada se esse período for superior a 72 horas. A Figura 5 representa um esquema de um corte transversal de uma gota espessa e o que ocorre após a desemoglobinização.

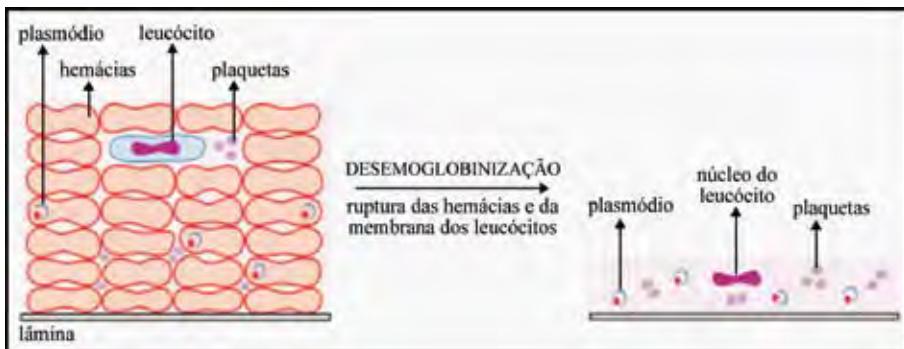


Figura 5: Corte transversal de uma gota espessa e o que ocorre após a desemoglobinação. Desenho adaptado por Heloísa Maria Nogueira Diniz.

Fonte: PRAT, J.G.; TRAID, M.C.; MORAIS, P.; ANDRADE, S.L. (orgs) *Combatendo a Malária no Parque Nacional do Jaú e Resex do Rio Unini*. Barcelona: Nucli d'estudis per a l'Amazônia de Catalunya-NeAC, 2009.

Os corantes utilizados para corar distensões sanguíneas ou gotas espessas são chamados de pancrômicos. É uma mistura de corantes de características neutras, dependentes do pH da solução corante, que em condições apropriadas coram os componentes nucleares e citoplasmáticos dos leucócitos, com predominância de tons vermelhos (quando ácidos) e azulados diversos (quando básicos).

A solução de coloração deve ser feita com certa antecedência e apenas uma pequena quantidade deve ser colocada em uso; para isso, aconselha-se transferir a mesma para um pequeno frasco com conta-gotas, o que tem como objetivo evitar a hidratação de toda a solução estoque. O corante deve ser mantido no frasco original, bem vedado, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar. Sob essas condições, permanece estável até a data de vencimento indicada no rótulo do frasco. Na prática diária o corante é utilizado sob forma de gotas. Devemos utilizar um pequeno frasco com conta-gotas, que possa ser periodicamente alimentado com o corante do frasco estoque.

Alguns corantes são soluções alcoólicas, por isso devemos tomar os cuidados inerentes ao uso do álcool em laboratório.

Devemos evitar pipetar o corante com o uso da boca. A ingestão acidental do metanol (presente em alguns corantes e também

utilizado como fixador) pode ser fatal, dependendo da quantidade absorvida. As soluções corantes são para uso exclusivo *in vitro*. Seu manuseio deve ser cuidadoso, evitando-se o contato com pele e mucosas. Em caso de contaminação accidental, lavar a área afetada em água corrente. O descarte do corante utilizado deverá obedecer aos critérios de biossegurança estabelecidos pelo laboratório.

Normalmente para a coloração de lâminas necessitamos do seguinte material:

- 1) Pissetas (frascos plásticos de lavagem);
- 2) Uma placa de acrílico (placa côncava para coloração);
- 3) Frasco conta-gotas;
- 4) Suporte próprio para colocar as lâminas na horizontal (para uma parte do processo de coloração);
- 5) Suporte próprio para colocar as lâminas na vertical (para secar as lâminas na última etapa da coloração);
- 6) Relógio marcador de tempo com alarme;
- 7) Proveta graduada de 100 ml;
- 8) Papel absorvente;
- 9) Solução de azul de metileno fosfato;
- 10) Água tamponada;
- 11) Solução do Corante.

2.3.1 COLETA DE SANGUE

- 1) Separar duas lâminas limpas deixando-as em superfície plana e horizontal;
- 2) Colocar uma das lâminas sobre uma superfície plana e manuseá-la pelas extremidades, evitando tocar as superfícies. A lâmina deve estar com etiqueta autoadesiva para o registro da identificação; a alternativa é usar lâmina com extremidade esmerilhada, onde a identificação é feita com lápis;
- 3) Calçar luvas de látex descartáveis;
- 4) Limpar vigorosamente a pele de local de punção (parte lateral do segundo ou do terceiro dedo da mão, lóbulo da orelha ou, em lactentes, o dedo grande do pé ou calcanhar) com gaze ou algodão embebido em álcool a 70%; posteriormente, enxugar com gaze ou algodão secos;
- 5) Retirar o estilete (lanceta) do envoltório estéril segurando-o firmemente (puxar a tampa de uma só vez). Segurar o dedo a ser punctionado entre o polegar e o indicador da mão do operador e punctionar o local de maneira firme e rápida. Remover a primeira gota de sangue com gaze ou algodão secos;
- 6) Comprimir o dedo suavemente (como em ordenha) para obter uma outra gota de sangue esférica sobre a pele seca. Cuidar para não tocar o ponto de saída do sangue. Segurar a lâmina firmemente pelas bordas da extremidade onde se encontra a etiqueta de identificação. Aproximar a lâmina ao dedo do paciente pela face onde consta a identificação, até tocar o alto da gota de sangue (evitando o contato com a pele). Se a quantidade de sangue for insuficiente, pode-se colocar outra gota ao lado da primeira ou até duas.

OBS: Este é o protocolo utilizado rotineiramente nos laboratórios de malária. Coletamos, em um canto da lâmina, 4 pequenas gotas de sangue, uma perto da outra, e no outro canto mais 4, também uma perto da outra (vide Figuras 6A e 6B).

2.3.2 GOTAS ESPESSAS (PROTÓCOLO 1)

1^º ETAPA: PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

- 1) Coletar o sangue por punção digital ou venosa, cujo detalhamento segue no protocolo seguinte.
- 2) Aplicar 4 gotas na parte central da lâmina, de maneira que fiquem próximas umas das outras. Tais gotas são reunidas para formar “uma mancha” circular de um centímetro de diâmetro ou quadrada; usa-se para isso a ponta de outra lâmina (Figura 6);

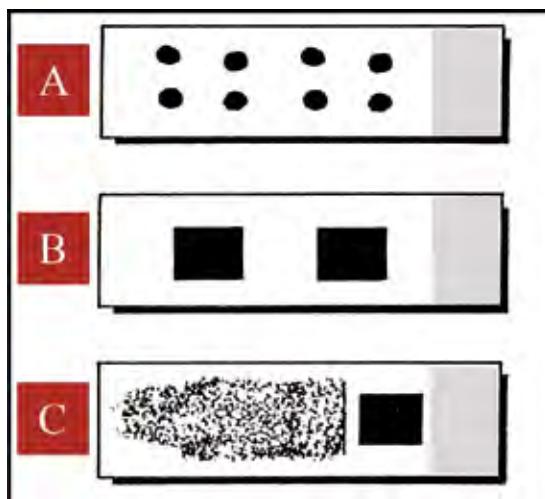


Figura 6: Confecção da gota espessa: A) Colocar 4 gotas de sangue formando um quadrado; B) Unir as gotas enchendo o quadrado; C) Esfregaço e gota espessa distendidos, na mesma lâmina.

Figura adaptada por Angela C. V. Junqueira.

Fonte: PESSOA, S B. *Parasitologia Médica*. 9a Ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1002 p.

- 3) Conservar a lâmina assim preparada em lugar abrigado, até que fique seca. Isto se obtém no mínimo após 1 hora;
- 4) Uma vez seca a camada espessa de sangue, desemoglobinizá-la colocando a lâmina em posição vertical e mergulhada em um frasco contendo água destilada morna;
- 5) A desemoglobinização verifica-se, geralmente, após 10 minutos. Ao retirar a lâmina da água, nota-se que o sangue perdeu sua cor, tornando-se esbranquiçado.

2^a ETAPA: COLORAÇÃO PELO GIEMSA

- 1) Após a desemoglobinização, sem fixar a preparação, empregar o método comum de coloração pelo Giemsa;
- 2) Em 2 ml de água destilada acrescentar 3 gotas de Giemsa (vide solução mãe no item Preparação de Soluções) e agitar bem. Cobrir a lâmina, já desemoglobinizada, com o Giemsa diluído e deixar cerca de 15 minutos;
- 3) Passados os 15 minutos, lavar a lâmina em água destilada e deixar secar.

OBS.: A gota espessa permite a concentração dos parasitos, pois, em lugar de uma única gota de sangue, empregam-se 3 a 4 gotas, por outro lado, não possibilita uma boa visualização das características morfológicas do parasita, conforme já relatado. É também conveniente fazer coletas periódicas, antes de dar o caso suspeito como negativo.

2.3.3. GOTA ESPESSA PROCOLOLO 2: MÉTODO DE COLORAÇÃO DE WALKER

MATERIAL NECESSÁRIO:

Além do material anteriormente descrito necessitamos de água tamponada de uma solução de azul de metileno fosfato e da solução de Giemsa.

1^a ETAPA: DESEMOGLOBINIZAÇÃO PELA SOLUÇÃO HIPOTÔNICA DE AZUL DE METILENO

- 1) Quando a amostra de sangue em gota espessa estiver bem seca (cerca de 20 minutos ou mais pós-coleta), aplicar sobre a mesma a solução de azul de metileno fosfatado e deixar por dois minutos. Testar este tempo antes de empregá-lo na rotina, pois às vezes ele é bem menor;
- 2) Enxaguar com água tamponada (sem jato forte).

2ª ETAPA: COLORAÇÃO PELA SOLUÇÃO DE GIEMSA

- 1) Colocar a lâmina com o lado da gota voltada para a superfície da placa de acrílico (invertida);
- 2) Preparar uma solução de Giemsa na proporção de uma gota de corante para 1ml de água tamponada. Homogeneizar;
- 3) Despejar a solução recém-preparada na placa de acrílico, onde já está a lâmina invertida;
- 4) Deixar corar por 10 minutos (testar esse tempo antes de empregá-lo na rotina);
- 5) Enxaguar com água tamponada (sem jato forte);
- 6) Deixar secar ao calor suave (Figura 7).

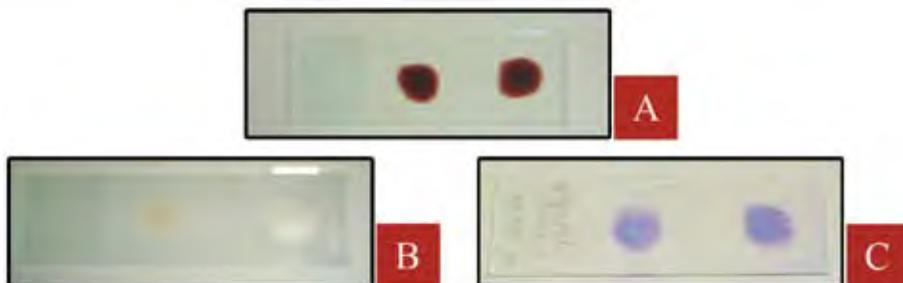


Figura 7: Lâmina de gota espessa: A) antes da desemoglobinização;

B) após a desemoglobinização; C) corada pelo Giemsa.

Fotografias de Carlos José de Carvalho Moreira.

OBS: I. A coloração pelo método Walker consiste em primeiro lugar no tratamento da gota espessa pela solução de azul de metíleno fosfatado para ser desemoglobinizada. Em segundo lugar a coloração pelo corante de Giemsa;

II. Nesse método não é recomendável imergir a lâmina na solução azul de metíleno (pré-coloração) e na água tamponada (lavagem) em copos, em virtude da contaminação destas soluções repetidamente usadas por vários dias, favorecendo a proliferação de bactérias e fungos. Para evitar essa desvantagem, utilizar as soluções contidas em pissetas (frasco usado para lavagem através de jatos do líquido nele contido) para enxaguar as amostras de sangue fixadas. O aumento do consumo é compensado com a boa qualidade das preparações, livre de artefatos e contatos com soluções contaminadas por sangue.

3. OUTROS MÉTODOS DE COLORAÇÃO:

3.1 GIEMSA TAMPONADO (APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA)

É recomendado para amostras de sangue e de cultura.

- 1) Fixar com metanol durante 10 minutos (no máximo);
- 2) Escorrer o metanol da lâmina e deixá-la secar;
- 3) Cobrir cada lâmina com HCl (ácido clorídrico) 5N (*) e deixar por 10 minutos. Após, lavar bem as lâminas sob um fluxo delicado de água corrente, durante aproximadamente 2 minutos. (não deve ficar resíduo de HCl). Deixar a lâmina secar;
- 4) Cobrir cada lâmina com a solução corante preparada com 1-2 gotas de Giemsa para cada ml do tampão de coloração (vide preparo do tampão em Preparo de Soluções). Corar durante 01h10min (em média);
- 5) Lavar as lâminas rapidamente sob um fluxo delicado de água corrente e deixar secar.

Notas importantes:

- a) É indubitavelmente melhor corar lâminas por este método com esfregaços feitos no mesmo dia. Observa-se assim uma coloração bem definida, com ausência de rastros de coloração no meio de cultura fixado na lâmina conjuntamente com o parasita, prejudicando o resultado da leitura;
- b) É de extrema importância adicionar somente HCl 5N em, no máximo, 5 lâminas por vez. Se houver aplicação numa quantidade maior de lâminas, durante a lavagem de cada uma a reação prosseguirá acima do período desejado nas outras, ocasionando a digestão de estruturas-alvo do parasita.
- c) Ao aplicar o HCl, procurar sempre fazer um colchão fino desta substância sobre a lâmina (1 gota por campo) Isto também evita a digestão excessiva do material pelo ácido;

d) Se possível, corar lâminas de cultura preferencialmente recém repicadas (em média de 4 dias de cultivo para Tripanossomas) em meio monofásico (LIT, por exemplo). Colorações realizadas em meio envelhecido ou bifásico (como meio NNN+LIT, por exemplo) não apresentam resultados excepcionais como os feitos sob esta recomendação. É aconselhável substituir o tempo de coloração para 45 min. ou por outro melhor período de acordo com observações prévias.

e) Pode-se encurtar a coloração para 1 hora, utilizando-se para isto 3 gotas de Giemsa para cada mililitro de tampão. Cobre-se toda lâmina com esta solução, tendo o cuidado com manuseio, pois manipulações excessivas induzem a precipitação do corante, ocasionando "borrões" de Giemsa na lâmina.

OBS: "() A passagem pelo HCl é opcional sendo particularmente indicada nas situações em que se deseja visualizar com clareza a posição relativa do núcleo e cinetoplasto (estudo da diferenciação celular). Pode não produzir os melhores resultados em esfregaços de sangue."*

"Nota: Esta técnica dá excelentes resultados e é uma adaptação daquelas utilizadas por IKITAWA & OGURA (1954), MÜHLFORDT (1963), e CARVALHO (1973), combinando a hidrólise ácida a frio da reação de Feulgen e a subsequente coloração do material com Giemsa tamponado."

3.2 COLORAÇÃO DE LÂMINAS DE FEZES DE TRIATOMÍNEOS (Usando corante Giemsa)

1^ª ETAPA: COLETA DA AMOSTRA E PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

- 1) Com o auxílio de duas pinças, coletar as fezes através de uma delicada compressão no abdômen do inseto, sem o sacrifício do mesmo;

2^ª ETAPA: COLORAÇÃO

- 1) Misturar as fezes obtidas com uma gota de solução de *Errecart* (vide preparo do tampão em **Preparo de Soluções**) e uma ou

- duas gotas de plasma humano ou de outro mamífero, que se saiba isento de hemoparasitas;
- 2) Espalhar a mistura como um esfregaço espesso de sangue, deixar secar, de preferência durante 12-24 horas;
 - 3) Corar pelo Giemsa, com bicarbonato de potássio, sem fixar;
 - 4) Lavar com cuidado, mergulhando a lâmina em água destilada;
 - 5) Deixar secar e examinar.

3.3 COLORAÇÃO DE LÂMINAS DE FEZES E DE TUBO DIGESTIVO DE TRIATOMÍNEOS (Utilizando os corantes May-Grünwald e Giemsa)

Neste tipo de coloração utilizamos 2 corantes diferentes: May-Grünwald e Giemsa. Esses dois corantes são utilizados através de um método de coloração mais demorado, em que após a fixação e a coloração pelo May-Grünwald, utilizamos uma segunda coloração com solução de Giemsa. Obtemos, com isso, uma coloração melhor, evidenciando o núcleo e o cinetoplasto do *T. cruzi* com tonalidades distintas.

O corante May-Grünwald, é um corante neutro sendo composto pela mistura de um corante ácido, a eosina, e por um corante básico, o azul de metileno. Ambos são solúveis em álcool metílico. Os elementos ácidos celulares (DNA e RNA) serão corados seletivamente pelo corante básico com a predominância de tons vermelhos. Os elementos básicos celulares (proteínas) serão seletivamente corados pelo corante ácido com a predominância de tons azulados.

1^º ETAPA: COLETA DA AMOSTRA E PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

- 1) Sacrificar o triatomíneo com clorofórmio ou éter;
- 2) Com uma tesoura realizar a retirada da parte posterior do abdômen;
- 3) Com a ajuda de pinças, retirar todo o tubo digestivo do inseto, através de movimentos de tração;

- 4) Macerar todo o conteúdo em duas ou três gotas de solução fisiológica;
- 5) Misturar o conteúdo do tubo digestivo do inseto com soro humano inativado ou de outro mamífero, que se saiba isento de hemoparasitas;
- 6) Realizar as distensões e deixar secar as lâminas “overnight” à temperatura ambiente ou em uma estufa a 28°C.

2º ETAPA: COLORAÇÃO

- 1) Cobrir toda a lâminas com May-Grünwald (solução de eosina azul de metileno segundo May-Grünwald comercial) por 3 minutos (testar o tempo de coloração de 1 a 3 minutos em no máximo 10 lâminas);
- 2) Adicionar a solução NaHCO_3 (Bicarbonato de Sódio) a 1%, homogeneizar e deixar durante 1 minuto (podemos utilizar a água da torneira desde que esta tenha o pH ~7,0);
- 3) Remover o fluido e cobrir as distensões com solução de Giemsa (30 gotas para 10 ml de água destilada ou da bica) durante 1 hora;
- 4) Desprezar o corante e lavar as lâminas em água corrente (fluxo fino).

OBS: 1. Segundo Maekelt (*The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v.13, n.1, p.11-15, 1964*), esta técnica de exame do tubo digestivo permite revelar um maior número de exemplares infectados;

2. Em nosso Laboratório utilizamos a água da torneira em substituição ao Bicarbonato de Sódio, pois o pH, em nossa região, é próximo de 7.0;

3. Verificamos que a secagem em estufa a 28°C, durante 2 horas, apresentou um bom resultado.

3.4 TÉCNICA DE COLORAÇÃO DE LÂMINAS DE FEZES BASEADO NO MÉTODO DOS LABORATORISTAS DE TOCANTINÓPOLIS (TO).

(Carlos Marinho Pereira, José da Silva Costa e Natanael Pereira Macedo)

MATERIAL NECESSÁRIO:

1) Placa de coloração (“mesa de descanso”, Figura 8);

OBS: Caso não possua uma placa de acrílico para coloração, uma similar pode ser improvisada com material de PVC de forma que a placa possua forma ligeiramente côncava.

- 2) Solução salina (ou soro fisiológico);
- 3) Solução de azul de metileno;
- 4) Solução de Giemsa;
- 5) Pisseta com água destilada (caso não tenha água tamponada);
- 6) Instrumentos: seringas de 1mL, lâminas, pipetas de 1mL, pinças, copos.

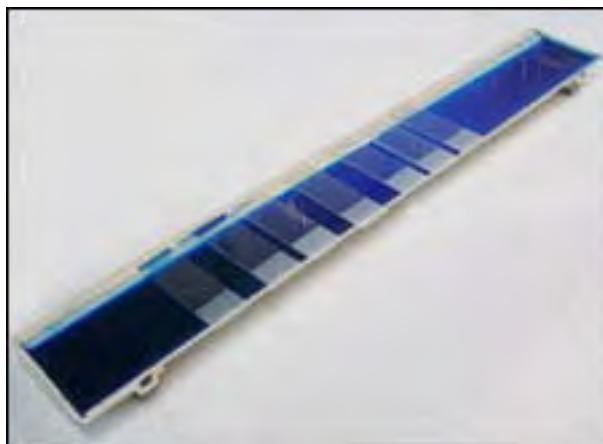


Figura 8: Placa de PVC para coloração de lâminas.

Foto: Marcello Pelliccione.

1^a ETAPA: COLETA DA AMOSTRA

- 1) Injetar 3 ou mais gotas de solução salina pela parte posterior do abdômen com seringa de 1 ml. Proceder da mesma forma inclusive se o triatomíneo estiver vivo. A solução salina dilui as fezes facilitando a visualização em lâmina.
- 2) Comprimir o abdômen do inseto com o uso de pinças para retirada das fezes. A prática de inserção da agulha seguida da compressão do abdômen pode eventualmente permitir a retirada de algum material oriundo do tubo digestivo juntamente com as fezes.
- 3) Deixar secar por ~ 2 a 3 horas.

2^a ETAPA: FIXAÇÃO PELO ÁLCOOL METÍLICO

- 1) Fixar com álcool metílico por ~ 1 minuto.
- 2) Deixar secar por ~ 10 min.

3^a ETAPA: PRÉ-COLORAÇÃO PELA SOLUÇÃO DE AZUL DE METILENO

- 1) Imergir a lâmina em solução de azul de metileno (em copo) rapidamente (~ por 2 segundos);
- 2) Enxaguar: Imergir a lâmina em água destilada (em copo) rapidamente (~ por 2 segundos).

4^a ETAPA: COLORAÇÃO PELA SOLUÇÃO DE GIEMSA

- 1) Colocar a lâmina com o lado da amostra (de fezes ou tubo digestivo macerado) para a superfície da placa de coloração;
- 2) Preparar uma solução de Giemsa na proporção de 1 gota de corante para 1ml de água destilada. A prática de filtrar o corante Giemsa antes de preparar a solução contribui para melhorar a qualidade do corante, e portanto, do resultado da coloração. Filtrar com papel filtro ou filtro descartável de café;
- 3) Aplicar esta solução na placa côncava de coloração, sob a lâmina invertida. A técnica de colocar a lâmina invertida sobre o lado côncavo da placa permite um maior contato da amostra com o

corante, resultando numa boa qualidade das preparações, com menor possibilidade de confusão por artefatos que dificultam ou impossibilitam o exame das lâminas;

- 4) Deixar corar por ~ 30 a 40 minutos;
- 5) Enxaguar imergindo rapidamente a lâmina em um copo com água destilada (~ por 2 segundos);
- 6) Secar por aproximadamente 15 minutos (de acordo com a temperatura e a umidade local).

OBS.: Desprezar as soluções de azul de metíleno, água e corante colocadas em copos e placa durante o preparo das lâminas. Não reutilizá-los para evitar contaminação.

4. AVALIAÇÃO DAS COLORAÇÕES:

4.1 ESFREGAÇO

- 1) A coloração do esfregaço está na dependência da espessura da camada de hemácias, bem como do método de coloração.
- 2) O esfregaço deve apresentar uma película fina e uniforme que não chega às bordas, com diminuição progressiva do sangue em direção ao final da lâmina, sem alcançar a extremidade, mas formando franjas.
- 3) A cor do esfregaço pode variar do cinza-claro ao rosáceo pálido, sendo padrão o seguinte:
 - Leucócitos: núcleo azul-escuro ou púrpura; o citoplasma dos neutrófilos, com granulações finas e rosa; dos eosinófilos róseo;
 - Plaquetas: azul ou púrpura;
 - Plasmódio: cromatina nuclear vermelha ou púrpura; citoplasma pode variar de azul-claro;
 - Granulações de Schuffner: rosa ou vermelha. A sua presença claramente definida, nas hemácias parasitadas pelo *P. vivax* ou *P. ovale*, é um bom indicador de coloração satisfatória.

4.2 GOTA ESPESSA

- 1) Quando a desemoglobinação é adequada, os elementos aparecem sobre um fundo claro.
- 2) Na espessura perfeita, cada campo microscópio (objetiva de imersão) deve apresentar 10 a 20 leucócitos, em média;
- 3) As cores dos elementos normais devem ser comparadas na seguinte ordem:
 - Os restos das hemácias azuis;
 - As plaquetas de rosa-vivo à violeta;
 - Os núcleos de leucócitos, geralmente azul-profundo à violeta;
 - Os grânulos finos dos neutrófilos, alguns rosa, outros azul-violeta;
 - Os grânulos grossos dos eosinófilos, em vermelho-cobre profundo;
 - O citoplasma dos linfócitos, em azul-pálido;
 - Os monócitos, com fino estroma cinza-azulado.

No exame de gota espessa, o fundo deve estar claro, o mais limpo possível e branco. A cromatina e o citoplasma dos plasmócitos são facilmente visualizados respectivamente nas cores vermelho-rosado e azul. O pigmento malárico, que não se cora, também aparece com nitidez e a cor varia do castanho ao escuro, sendo mais visível, entretanto, nas preparações descoradas e no sangue a fresco em tubo capilar (QBC).

As preparações supercoradas e precipitadas pelo corante Giemsa podem ser rapidamente descoradas pelo álcool metílico para exame.

5. PROCEDIMENTOS BÁSICOS PARA EXAME DO MATERIAL CORADO

- Antes de iniciar o exame, limpar as superfícies superiores das lentes oculares e inferiores das objetivas, condensador e espelho com papel macio e absorvente. O pó depositado na parte interna dos tubos do corpo binocular pode ser removido com jatos de ar produzidos por uma pera de borracha;
- Adaptar a lâmina às presilhas da platina mecânica e a seguir ajustar a lâmina de modo que uma área da amostra a ser examinada coincida com o orifício de iluminação;
- Regular o sistema de iluminação do microscópio, fechando um pouco o diafragma-íris ou abaixando o condensador. Regular a intensidade da luz através do reostato ou do balão de vidro, se for o caso;
- Posicionar a objetiva de 10x na direção da amostra e fazer a focalização com o botão macrométrico até que surjam os leucócitos, no caso de amostras de sangue. A seguir ajustar o foco com o botão micrométrico. Examinar até encontrar um campo com maior número de leucócitos;
- Focalizado o campo, adicionar óleo de imersão no centro do mesmo e girar o revólver até a objetiva de imersão (100x). Abrir o diafragma-íris e levantar o condensador;
- Examinar os campos microscópicos movimentando os parafusos de avanço frontal e lateral do carro (*charriot*) com a mão direita e botão micrométrico com a esquerda. Buscar os campos que apresentem maior homogeneidade na distribuição das células;
- Terminado o exame, baixar a platina, retirar a lâmina e registrar os resultados. Colocar a lâmina invertida sobre um papel absorvente, para que haja absorção do óleo. Não usar xitol e nem tolueno para a remoção do óleo de imersão. Após absorção, acondicionar as lâminas em caixas apropriadas para futura revisão;

- Não usar também solvente como álcool, xanol ou tolueno para a limpeza dos componentes do equipamento. O óleo mineral é facilmente removido por papel absorvente, passado sobre a lente de imersão;
- Após o uso, o microscópio deverá ser coberto com uma capa plástica ou colocado na caixa original. A caixa deverá sempre conter um saco de sílica-gel para manter o ambiente interno seco. Em áreas de elevada umidade, como a Amazônia, a utilização de estufas de madeira, dotadas de uma lâmpada de 25 watts constantemente acesa, é mais eficiente que o uso da sílica. O ambiente constantemente seco é ideal, pois impede o desenvolvimento de fungos no sistema de lentes;
- Outro cuidado importante é sempre transportá-lo pela estativa (braço), com apoio da mão sob a base, e nunca pelos parafusos.

6. PREPARO DE SOLUÇÕES PARA A COLORAÇÃO

6.1 SOLUÇÃO CORANTE DE GIEMSA

Corante de Giemsa em pó	1 g
Glicerina	66 ml
Álcool metílico puro	66 ml

Adicionar o pó do corante em um gral. A seguir, acrescentar a glicerina, aos poucos, misturando com o auxílio de um pistilo. Aquecer em uma placa a 60º C por 2 horas. Após as 2 horas, adicionar o álcool metílico lentamente, homogeneizando a solução. Transferir para um frasco contendo pérolas de vidro que irão facilitar a dissolução. Amadurecer a solução, deixando em repouso por 7-14 dias. Posteriormente, filtrar em papel de filtro e transferir para um frasco âmbar. Conservar em lugar fresco.

Fonte: SIMONS, A. *Technical Hematology*. Philadelphia & Toronto: J.B.Lippincott Company, 1976. 476p

6.2 SOLUÇÃO DE *Errecart*

Formol comercial (40%)..... 1 ml
Ácido Acético 0,2 ml
Solução Fisiológica 100 ml

6.3 GIEMSA ALCALINO

Adicionar uma solução a 1 % de Bicarbonato de potássio à solução corante, na proporção de uma gota daquela para cada 10 ml do corante.

Fonte: Pessoa, S B. *Parasitologia médica*. 9^a ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1002 p.

6.4 COMPOSIÇÃO DA ÁGUA TAMPONADA UTILIZADA NA COLORAÇÃO DE GIEMSA (pH=6.8)

Solução A

Fórmula: KH_2PO_4 (fosfato de potássio monobásico)

Peso Molecular: 136.09

Preparar uma solução estoque 0,15 M: 9,08 g, qsp 1 litro de H_2O

Solução B

Fórmula: Na_2HPO_4 (fosfato de sódio bibásico)

Peso Molecular: 141.96

Preparar uma solução estoque 0,15 M: 9,47 g, qsp 1 litro de H_2O

pH	Solução A	Solução B	Total
6,8	50,8 ml	49,2 ml	100 ml
7,2	28,0 ml	72,0 ml	100 ml

Mistura para se obter 100 ml de água tamponada.

Fonte: SIMONS, A. *Technical Hematology*. Philadelphia & Toronto: J.B.Lippincott Company, 1976. 476p.

6.5 COMPOSIÇÃO DO TAMPÃO DE COLORAÇÃO (pH 7,2)

Soluções estoque

Solução A

Fórmula: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (fosfato de sódio monobásico)

Peso Molecular: 177,96

Preparar uma solução estoque 0,2 M: 35,59 g qsp 1 litro de H_2O

Solução B

Fórmula: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. (fosfato de sódio dibásico)

Peso Molecular: 357, 96

Preparar uma solução estoque 0,2 M: 71,59 g, qsp 1 litro de H_2O

Tampão de Coloração:

Prepare o Tampão utilizando 100 ml da solução estoque + 900 ml de água destilada e estoque a 4 ° C.

Fonte: Sousa, M.A. *Biologia e taxonomia de tripanosomatídeos*. Apostila do Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária. Rio de Janeiro, IOC-FIOCRUZ, 2000. 57 p.

pH	Solução A	Solução B
7,2	280 ml	720 ml

OBS: Sendo necessário ajuste o pH a 7,2 com HCl ou NaOH.

6.6 CORANTES E DILUENTES PARA O MÉTODO DE WALKER

Solução de azul de metileno fosfatado

1) Pesar as seguintes substâncias:

Azul de metileno (medicinal em pó) 1,0g

Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4)..... 1,0g

Fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4)3,0g

Misturar em gral seco.

2) Pesar 1,0g da mistura acima e dissolver em 250ml de água destilada, de chuva ou mineral sem gás.

Mistura de sais fosfatados (água tamponada 6.4)

1) Pesar as seguintes substâncias:

Fosfato de potássio monobásico 4,0g

Fosfato de sódio bibásico 6,0g

Misturar em gral seco.

2) Pesar 1,0g da mistura acima e dissolver em 1.000ml de água destilada, de chuva ou mineral sem gás.

Solução Alcoólica de Giemsa

1) Pesar e medir as seguintes substâncias:

Giemsa em pó 0,75g

Glicerol (P.A.) 35 ml

Álcool metílico (P.A.) 65 ml

2) Transferir o *Giemsa* em pó para um gral; a seguir ir acrescentando muito lentamente o glicerol, sempre misturando até formar uma massa homogênea. Por último adicionar o álcool metílico também aos poucos. Assim que estiver bem dissolvido, transferir para um frasco escuro (âmbar) contendo dentro algumas pérolas de vidro. Inicialmente agitar várias vezes ao dia, até obter completa homogeneização; depois deixar em repouso alguns dias e, antes de usar, filtrar em papel de filtro.

7. PROCEDIMENTOS DE EXAME DE TRIATOMÍNEOS:

7.1 EXAME DAS FEZES DE TRIATOMÍNEOS

- 1) Fazer uma pequena compressão no abdômen do inseto e depositar as fezes ou urina obtida sobre uma lâmina que já deverá conter um pequeno volume de salina, homogeneizar o material com a extremidade de uma lâmina e cobrir a seguir com uma lamínula (20x20 ou 22x22);
- 2) Levar ao microscópio e fazer a leitura utilizando objetiva de maior poder ampliador (ideal 400X);
- 3) Se for positiva, recomenda-se fazer uma distensão e corar o material, com o mesmo objetivo já descrito anteriormente.

7.2 EXAME DO TUBO DIGESTIVO DE TRIATOMÍNEOS

- 1) Sacrificar o triatomíneo com clorofórmio ou éter;
- 2) Com uma tesoura realizar a retirada da parte posterior do abdômen (Figuras 9A e B);
- 3) Com a ajuda de pinças retirar todo o tubo digestivo do inseto, através de movimentos de tração (Figuras 9C e D);
- 4) Macerar todo o conteúdo em duas ou três gotas de solução fisiológica;
- 5) Colocar o macerado sobre uma lâmina que já deverá conter um pequeno volume de salina, homogeneizar o material com a extremidade de outra lâmina e cobrir a seguir com uma lamínula (20x20 ou 22x22);
- 6) Levar ao microscópio e fazer a leitura utilizando objetiva de maior poder ampliador (ideal 400X);
- 7) Se for positiva, recomenda-se fazer uma distensão e corar o material, com o mesmo objetivo já descrito anteriormente.

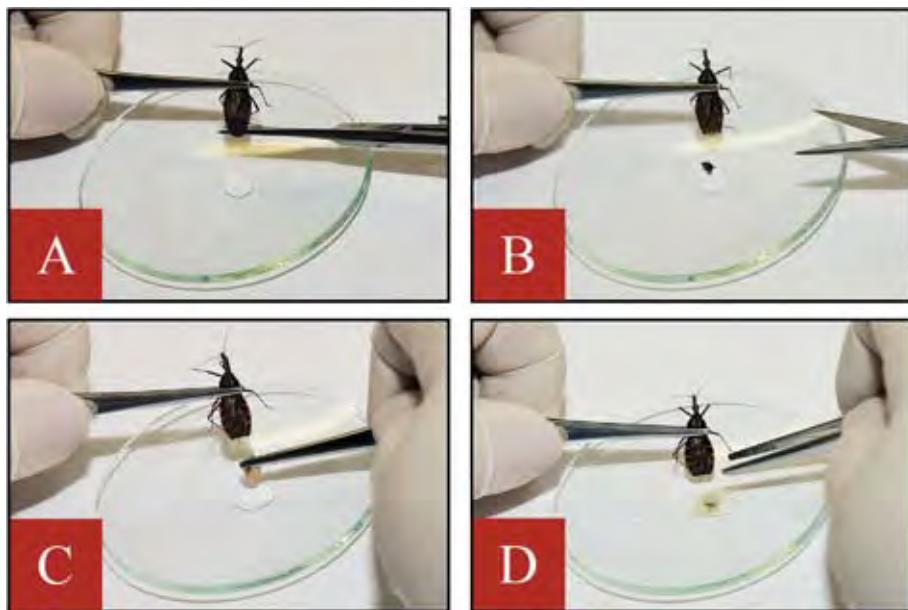


Figura 9: Sequência de retirada do tubo digestivo do inseto para exame.

Fotografias de Marco Aurélio Peregrino.

7.3 EXAME DA HEMOLINFA (diagnóstico diferencial com *Trypanosoma rangeli*)

- 1) Sacrificar o triatomíneo com clorofórmio ou éter;
- 2) Fazer um pequeno corte em qualquer uma das patas por onde fluirá a hemolinfa;
- 3) Depositar a hemolinfa sobre a lâmina e cobrir com uma lamínula;
- 4) Levar ao microscópio e fazer a leitura utilizando o aumento de 400 X.

7.4 EXAME DA GLÂNDULA SALIVAR (diagnóstico diferencial com *Trypanosoma rangeli*)

- 1) Após a retirada da hemolinfa, fazer a contenção do inseto, através do uso de uma pinça, apertando-o contra uma lâmina de vidro;
- 2) Com outra pinça puxar a cabeça do inseto de modo a decapitá-lo e a expor as glândulas salivares;
- 3) Examinar as glândulas salivares entre lâmina e lamínula.

8. RECOMENDAÇÕES IMPORTANTES:

- As lâminas empregadas devem estar bem limpas e desengorduradas. Para desengordurar, deixar as lâminas imersas em uma solução de álcool etílico mais éter (proporção de 9:1). Nunca empregar lâminas que apresentem manchas causadas pela oxidação;
- As lâminas usadas podem ser limpas em água com sabão em pó (1 colher de sopa cheia para cada litro d'água), deixando em repouso por 48 horas. Depois devem ser muito bem enxaguadas e enxutas com uma toalha limpa;
- Sempre ter em mente os cuidados com biossegurança, utilizando os equipamentos de proteção individuais (EPIs), como luvas de látex, jalecos, protetores faciais, etc;
- Quando empregar água da torneira, verificar o pH, pois existem significativas variações de pH conforme a fonte da água;
- Testar o fixador e os corantes, antes do uso, pela primeira vez, ou após um longo período de estocagem. Sempre utilizar produtos de qualidade e evitar produtos hidratados;
- Deixar as lâminas secarem em local arejado e em superfície plana. A dessecção rápida das células é indispensável para uma boa conservação morfológica. Quando possível, colocá-las em uma estufa a 28º C, principalmente em locais com alta umidade. Nunca usar aquecimento para secá-las;

- Em uma boa preparação a distensão deve ser delgada, isto é, as células devem estar estendidas em uma única camada, sem superposição e nem formação de grãos ou flocos. No caso de amostra de sangue, os glóbulos brancos devem apresentar coloração rosácea. Sua imagem deve ser clara, nítida e uniforme, não contendo manchas de corante nem bolhas de ar ou falhas, assim como rupturas ou pontos de desagregação;
- As distensões, feitas a partir de sangue coletado com anticoagulante, devem ser coradas até o período de 30 min, para se evitarem deformações celulares;
- É imprescindível que seja colocada uma etiqueta contendo o nome do paciente e a origem (nome, nº de registro, local e a data de obtenção da amostra biológica). O rótulo deve ser escrito a lápis e colado na borda da lâmina. Se a lâmina tiver a borda esmerilhada, escrever na parte fosca;
- Sempre fazer um teste prévio para estimar o tempo de coloração ideal;
- No protocolo da gota espessa, tanto a desemoglobínização como as etapas de coloração e lavagem devem ser executadas muito cuidadosamente, a fim de não desorganizar ou desprender a camada de sangue não fixada;
- As lâminas, após serem coradas, devem ser guardadas em caixas apropriadas até o momento da leitura ou em papel absorvente;
- A amostra corada deve ser examinada ao microscópio, empregando a objetiva de imersão (100X).

BIBLIOGRAFIA

- ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.B.; FARMER, M.A.; ANDERSEN, R.A.; ANDERSON, O.R.; BARTA, J.R.; BOWSER, S.S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R.A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T.Y.; KARPOV, S.; KRUGENS, P.; KRUG, J.; LANE, C.E.; LEWIS, L.A.; LODGE, J.; LYNN, D.H.; MANN, D.G.; MCCOURT, R.M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.E.; NERAD, T.A.; SHEARER, C.A.; SMIRNOV, A.V.; SPIEGEL, F.W. AND TAYLOR, M.F.J.R. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 52, n. 5, p.399 – 451 2005.
- AGUILAR, H. M.; ABAD-FRANCH, F.; DIAS, J.C.P.; JUNQUEIRA, A.C.V.; COURAS, J.R. Chagas disease in the Amazon Region. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102 (suppl. 1), p. 47-56, 2007.
- AMATO NETO, V.; SANTOS, R.R.; GIOIA, I. Estudo experimental sobre o congelamento do plasma e implicações referentes à transmissão da doença de Chagas em serviços de hemoterapia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.9, n.3, p.129-132, 1975.
- AMATO NETO, V.; NAGASSE T.K.; MOREIRA A.A.B.; GOMES A.E.C.; CAMPOS R. Utilização, em politransfundidos, da pesquisa de anticorpos IgM anti-*Trypanosoma cruzi* e anti-*Toxoplasma gondii* para detectar infecções pós-transfusionais recentes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.26, n.2, p.83-86, 1984.
- AMATO NETO, V.; MATSUBARA, L.; LANURA, P.N.B. Avaliação do sistema quantitative buffy coat (QBC) no diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo em modelo experimental murino. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.29, p.59-61, 1996.
- ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M.; ANDRADE, Z.A. Recuperação e caracterização de tripanossomas inoculados em animais imunes (Reinoculação com diferentes cepas do *T.cruzi*). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 12, p. 395-402, 1970 a.
- ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gazeta Médica da Bahia*, v.70, p. 32-42, 1970b.
- ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Revista Patologia Tropical*, v. 3, p.: 165-121 1974.
- ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 (suppl. I): 429-432, 1999.
- AVILA, H.A.; SIGMAN D.S.; COHEN, L.M.; MILLIKAN, R.C.; SIMPSON L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas'disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.48, p.211–221, 1991.
- BARATA, J.M.S.; ROCHA, R.M.; RODRIGUES, V.L.C.C.; FERRAZ FILHO, A.N. Primeiro caso autóctone de tripanossomíase americana do Estado do Acre (Brasil) e sua correlação com as cepas isoladas do caso humano e de triatomíneos silvestres da área. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, v.22, n.5, p.401-410, 1988.
- BARBOSA, C.C.S.; VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; GOMES, F.S.; FREITAS, A.B.; SILVA, L.O.S.; FONSECA, J.M.C.; SILVA, A.S. Concordância entre o QBC, Xenodiagnóstico e Teste Sorológico no Diagnóstico de Fase Aguda da Doença de Chagas. In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, FLORIANÓPOLIS/ SC. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38 (Suppl.1), p.308-309, 2005.

BARKER Jr., R. H. DNA Probe Diagnosis of Parasite Infections. *Experimental Parasitology*, v.70, p.494-499, 1990.

BARRETO, M. P. Epidemiologia. In: Brener, Z., & Andrade, Z. *Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas*. 1^a Edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1979, p. 89-151.

BARRETT, T.V. *Parasites and predators of triatominae*. In: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. PAHO/WHO Scientific Publication n. 318, p. 24-32, 1975.

BASSO, B.; CASTRO, I.; INTROINI, V.; GIL, P.; TRUYENS, C.; MORETTI, E. Vaccination with *Trypanosoma rangeli* reduces the infectiousness of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*, v. 25, p.3855-3858, 2007.

BATISTA, A.M., AGUIAR, C.; ALMEIDA, E.A.; GUARENTO, M.E.; WANDERLEY, J.S.; COSTA, S.C. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. *International Journal of Infectious Diseases*, v.11, p. 974-7, 2010.

BECAK, W.; PAULETE, J. Sangue: Técnicas de Citologia e Histologia. Rio de Janeiro: Editora Livros Técnicos e Científicos, 1 v., 306 p, 1976.

BERGOGLIO, R.M. Enfermedad de Chagas Postransfusional: experiência clínica de 48 casos. *La Prensa Médica Argentina*, v.71, n.2, p. 49-52, 1984.

BORGES-PEREIRA, J.; WILLCOX, H.P.F.; MARCONDES, C.B.; COURA, J.R. Parasitemia em pacientes chagásicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.22, n.1, p.39-44, 1989.

BORGES-PEREIRA, J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; SANTOS, L.C.; CASTRO, J.A.F.; ARAÚJO, I.B.; COURA, J.R. Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica: 1-Sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.29, n.4, p.341-347, 1996.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Tratamento Etiológico da Doença de Chagas-Brasília: Fundação Nacional de Saúde*. Coordenação de Controle de Doenças Transmissíveis Por Vetores - Gerência Técnica de Doenças de Chagas, 32p, 1996.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Manual de treinamento em diagnóstico laboratorial de malária*. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília: Ministério da Saúde, 26 p, 1997.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Tratamento etiológico da doença de Chagas*. 2^a edição p. 32, Brasília, 1997.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. *Doença de Chagas-Triagem e diagnóstico sorológico em unidades hemoterápicas e laboratórios de saúde pública*.- Brasília: Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, 76p, 1998.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Apostila do Curso de Capacitação em Revisão de Lâminas de Malária*. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Coordenação Nacional de Laboratório de Saúde Pública (COLAB). Brasília, 20p, 2000.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE . *Manual de diagnóstico laboratorial da malária* (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 116 p, 2005.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Portaria nº05 de 21 de fevereiro de 2006*. Brasília: Diário Oficial da União, p.34, Seção I. 2006.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Doença de Chagas Aguda. Instrumento para Preenchimento de Ficha de Investigação- Sinan- NET*. 2006, 3p. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/Documentos/SinanNet/instrucoes/Chagas.pdf>. Acesso em 17/09/2007.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA E SAÚDE. *Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan: Normas e Rotinas*. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 80p. Disponível em:<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_sinan.pdf>. Acesso em: 17/09/2007.

_____. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde-CIEVS. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.12p. Disponível em:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apostila_cievs_bilingue.pdf>. Acesso em: 17/09/2007.

_____. SECRETARIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Doença de Chagas Aguda: Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no Sinan*. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_chagas.pdf (acessado em 2011).

_____. SUPERINTENDÊNCIA DE CAMPANHAS DE SAÚDE PÚBLICA. *Manual de normas técnicas da campanha de controle da doença de Chagas*. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 1985.

BRASILEIRO FILHO, G.; PENA, S.D.J. Molecular biological techniques for the diagnosis of infectious diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.25, p.59, 1992.

BRENER, Z. *Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas*. Belo Horizonte; 1961 (Tese de Livre Docência). Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1961.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4: 389-396, 1962.

BRENER, Z., CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.5, n.5, p. 220-224, 1963.

BRENER, Z. *Significance of morphologic variation of bloodstream forms*. In: New Approaches in American Trypanosomiasis Research. PAHO/WHO Scientific Publication n. 318, p. 127-131, 1975.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 431p, 2000.

BRENIERE, S.F.; BOSSENO, M.F.; TELLERIA, J.; CARRASCO, R; VARGAS, F.; YAKSIC, N.; NOIREAU, F. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in bolivian triatomines. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.53(2), p.179-84, 1995.

BRONFEN, E. Xenodiagnóstico: Isolamento do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da doença de Chagas. 1989. 165 p.(Tese de doutorado), Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 1989.

BRUMPT, P.E. Le Xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, v.77, p. 706-710, 1914.

BUDZKO, D.B.; KIERSZENBAUM, F. Isolation of *Trypanosoma cruzi* from blood. *The Journal of Parasitology*, v.60, n.6, p.1037-1038, 1974.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.8, n.5, p.227-234, 1966.

CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; CORREA, N.S.; PERES, B.A. Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride, formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.13, p.45-50, 1971.

CAMARGO, M.E.; SILVA, G.R.; CASTILHO, E.A.; SILVEIRA, A.C. Inquérito sorológico de prevalência de infecção chagásica no Brasil - 1975/1980. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.26, n.4, p.192-204, 1984.

CAMARGO, M.E. Serological Diagnosis. An appraisal of Chagas disease serodiagnosis. In: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.E. Rassi, A. (eds.). *Chagas disease (American trypanosomiasis): Its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. São Paulo: ISBT Brasil, p. 165-178, 1992.

CANÇADO, J.R.; MARRA, U.D.; LOPES, M.; MOURÃO, O.; FARIA, C.A.F.; ALVARES, J.M.; SALGADO, A.A. Toxicidad y valor terapéutico del Bay 2502 en la enfermedad de Chagas crónica en tres esquemas posológicos. *Boletín Chileno de Parasitología*, v.24, p.28-32, 1969.

CARVALHO, A.L.M. ESTUDO SOBRE A POSIÇÃO SISTEMÁTICA, A BIOLOGIA E A TRANSMISSÃO DE TRIPANOSOMÁIDEOS ENCONTRADOS EM ZELOS LEUCOGRAMMUS (PETRY 1834) (HEMIPTERA, REDUVIIDAE). *REVISTA DE PATOLOGIA TROPICAL*, V.2, P.223-274, 1973.

CASTRO, N.; ALVES, M.T.; MACEDO, V.O. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia Na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, n.16, n.2, p. 98-113, 1983.

CARDOSO, A.V.N.; LESCANO, S.A.Z.; AMATO NETO, V.; GAKIYA, E.; SANTOS, S.V. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, n.5, p. 287-289, 2006.

CARVALHO-MOREIRA C.J.; SPATA M.C.D.; COURA J.R.; GARCIA E.S.; AZAMBUJA P.; GONZALEZ M.S.; MELLO C.B. In vivo and in vitro metacyclogenesis tests of two strains of *Trypanosoma cruzi* in the triatomine vectors *Triatoma pseudomaculata* and *Rhodnius neglectus*: short/long-term and comparative study. *Experimental Parasitology*, v. 103, n. 3, p. 102-111, 2003.

CERISOLA, J.A.; DEL PRADO, C.E.; ROHWEDDER, R.W.; BOZZINI, J.P., *Blastocrithidia triatoma* n. sp. found in *Triatoma infestans* from Argentina. *Journal of Protozoology*, v.18, p.503-506, 1971.

CERISOLA, J.A.; ROHWEDDER, R.W.; DEL PRADO, C.E. Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatomíos. *Boletín Chileno de Parasitología*, v.26, p.57-58, 1971.

CERISOLA, J.A.; ROHWEDDER, R.; SEGURA, E.L.; DEL PRADO, C.E.; ALVAREZ, M; MARTINI, G.J.W. *El xenodiagnóstico*. Monografía. Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatala Chaben". Buenos Aires, Argentina. 1974.

CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.1, p.159-218, 1909.

CHIARI, E.; DIAS, J.C.P. Nota sobre uma nova técnica de hemocultura para diagnóstico parasitológico na doença de Chagas na sua fase crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.9, p.133-6, 1975

CHIEFFI, P.P.; AMATO NETO, V. (orgs.) *Prevenção Referente às Modalidades Alternativas de Transmissão do Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro: CLB Balieiro Editores, São Paulo, 31 p, 2000.

COSTA-NEVES, V. Avaliação de protocolos de extração de DNA empregados na detecção de *Trypanosoma cruzi*, Chagas 1909, por PCR em triatomíneos. 2010. 175p. Dissertação de Mestrado, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2010.

COURA, J.R.; FERREIRA, L.F.; RUBENS, J.; PEREIRA, N.C.; SILVA, J.R. Tripanossoma do "complexo cruzi" em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de suapatogenicidade. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.8, p. 125-133, 1966.

COURA, J.R.; ABREU, L.L.; DUBOIS, L.E.G.; LIMA, F.C.; ARRUDA Jr, E.R.; WILLCOX, H.P.F.; ANUNZIATO, N.; PETANA, W. Morbidade da doença de Chagas. II - Estudos seccionais em quatro áreas de campo do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.79, n.1, p.101-124, 1984.

COURA, J.R.; FERNANDES, O.; ARBOLEDA, M.; BARRET, T.V.; CARRARA, N.; DEGRAVE, W.; CAMPBELL, A.C. Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 90, p.278-279, 1996.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; BOIA, M.N.; FERNANDES, O. Chagas disease: from bush to huts and houses. Is it the case of the Brazilian Amazon? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94 (Suppl. I), p.379-384, 1999.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; VALENTE, S.A.S.; MILES, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in Parasitology*, v.18, n.4, p.171-176, 2002 b.

COURA, J.R.; CARVALHO-MOREIRA, C.J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; *Tripanossomíase rangeli*. In: Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , p. 685-689, 2005.

CRESCENTE, J.A.; VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C. Ocorrência de 4 casos agudos de doença de Chagas na Vila de Icoaraci-PA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 25 (Suppl. I), p. 29, 1992.

CUNHA, R.P.A.; GIL, L.H.S.; GARBERO, R.M.F.; SOUZA, C.S.; SALCEDO, J.M.V.; HONDA, E.; ESQUERDO, R.P.; PEREIRA DA SILVA, L.H.; TADA, M.S. Doença de Chagas aguda na Amazônia: descrição de um caso autóctone na fronteira Brasil/Bolívia e avaliação do potencial endêmico da região. In: XL CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.37 (Suppl. I), p. 31, 2004.

CUPOLILLO, E.; GRIMALDI, Jr. G.; MOMEN, H.; BEVERLEY, S.M. Intergenic region typing (IRT): a rapid molecular approach to the characterization and evolution of *Leishmania*. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 73, p.145-155, 1995.

D'ALESSANDRO A. *Biology of Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In Lumsden WHR, Evans DA (eds.), *Biology of Kinetoplastida*, Academic Press, London, vol. 1, p. 237-403, 1976.

D'ALESSANDRO, A.; SARAIVA N. G. *Trypanosoma rangeli*. In: Protozoal Diseases (ed. Gilles, H. M.), London: Edward Arnold, London, p. 398-412, 1999.

DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S. P.; BRITTO, C.; HEUVERSWYN, H. VAN; KIDANE, G. Z.; CARDOSO, M. A. B.; MUELLER, R. U.; SIMPSON, L. and MOREL, C. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. v. 27, p. 63-70. 1988.

DESLOIRE, S.; VALIENTE MORO, C.; CHAUVE, C.; ZENNER, L. COMPARISON OF FOUR METHODS OF EXTRACTING DNA FROM D. GALLINAE (ACARI: DERMANYSSIDAE). *VETERINARY RESEARCH*, V.37, P.725-32, 2006;

DEVERA, R. A. Caracterização Biológica, Bioquímica e Molecular de Cepas do *Trypanosoma cruzi*, Antes e Após Passagens em Camundongos e em Cultura (Tese). Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Rio de Janeiro, 2002.

DIAS, E. Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.35, p. 335-342, 1940.

DIAS, E. Epidemiologia e profilaxia da doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina*, v.4, n.4, p.303-317, 1958.

DIAS, J.C.P.; COURRA JR. Epidemiologia. In: *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral* (JCP. Dias & JR Courra, org.), Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p. 33-66, 1997.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas* (Z. Brener, Z. A. Andrade & M. Barral Netto, orgs). Rio de Janeiro:Ed. Guanabara Koogan, p.48-74, 1999.

DIAS, J.C.P. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, (suppl. III), p.7-29. 2005.

DIAS, J.C.P.; MACEDO, V.O. *Doença de Chagas*. In: Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , p.557-593, 2005.

DIAS, J.C.P. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n. 4, p. 370-375, 2006.

EICHLER, S.; SCHAUB, G.A. Development of symbionts in triatomine bugs and the effects of infections with trypanosomatids. *Experimental Parasitology*, v. 100, n.1, p.17-27, 2002.

ELIAS, F.E.; VIGLIANO, C.A.; LAGUENS, R.P.; LEVIN, M.J.; BEREK, C. Analysis of the presence of *Trypanosoma cruzi* in the heart tissue of three patients with chronic Chagas'heart disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.68, n.2, p. 242-247, 2003.

ERLICH, H.; GELFAND, D.; SNINSKY, J.J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, v. 252, p. 1643-51, 1991.

FREILIJ, H.; MULLER, L.; GONZÁLEZ CAPPA, S.M.G. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 18, n.2, p. 327-330, 1983.

FIFE Jr., E.H.; MUSCHEL, L.H. Fluorescent antibody technic for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. *Proceedings Society Experimental Biology Medicine*, v. 101, p.540-543, 1959.

FERREIRA, A.W.; ÁVILA, S. L. M. *Diagnóstico de Laboratório das principais doenças infecciosas, parasitárias e auto-imunes. Correlação Clínico-Laboratorial.* 2º. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 443 p, 2001.

FORATTINI, O.P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, v. 14, p. 265-299, 1980.

FREITAS, J.L.P. *Contribuição para o estudo do diagnóstico da moléstia de Chagas por processos de laboratório.* (Tese). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1947.

GALHARDO, M.C.G.; MARTINS, I.A.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S.S.; COELHO, J.M.C.; JUNQUEIRA, A.C.V.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Reativação da infecção por *Trypanosoma cruzi* em paciente com síndrome de imunodeficiência adquirida. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, vol.32, n. 3, p.291-294, 1999.

GOMES, Y. M.; LEAL, T. C. A.; SILVA, M. R.; SANTIAGO, C. M. G.; COUTINHO, E. M. Caracterização de uma cepa de *Trypanosoma cruzi* isolada de uma zona não endêmica no Nordeste do Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 37, n. 1, p. 87-89, 1995.

GOMES, M.L.; GALVAO, L.M.C.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J.; CHIARI, E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 60(2), p.205-10, 1999.

GUHL, F.; JARAMILLO, C.; YOCKTENG, R.; VALLEJO, G.A.; CÁRDENAS-ARROYO, F. *Trypanosoma cruzi* DNA in human mummies. *The Lancet*, v. 349, n.10, p.1370. 1997.

HALOS, L.; JAMAL, T.; VIAL, L.; MAILLARD, R.; SUAU, A.; LE MENACH, A.; BOULOUIS, H.J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Veterinary Research*, v. 35, p. 709-13, 2004.

HOARE, C.A. *The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph.* 1 ed. Oxford and Edinburgh: Blackwell 749 p. Scientific publications LTD, 749 p, 1972.

IKITAWA, O & OGURA, Y. The fuelgen reaction after hydrolysis at room temperature. *Stain Technics*, v.29, p.13-15, 1954

JUNQUEIRA, A.C.V. *Um estudo sobre o xenodiagnóstico, a hemocultura e a reação em cadeia da polimerase na detecção do Trypanosoma cruzi, Chagas 1909, em indivíduos na fase crônica da infecção chagásica.* 173 p. (dissertação de mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais-Belo Horizonte, 1996.

JUNQUEIRA, A.C.V.; CHIARI, E.; WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicina and Hygiene*, v.90, p. 129-32, 1996.

JUNQUEIRA, A.C.V. *Trypanosoma cruzi Chagas, 1909 em áreas do Médio e Alto Rio Negro-Amazonas, Brasil.*134 p. (tese de doutorado) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

JUNQUEIRA, A.C.V.; ALBAJAR, P.V.; COURAS, J.R. Doença de Chagas na Amazônia Brasileira In: Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , p. 595-601, 2005.

KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, R.; MOLINEUX, I.; KHORANA, H.G. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *Journal of Molecular Biology*, v. 56, p. 341-61, 1971.

KNIERIM.F.; RUBINSTEIN, P. The detection of Chagas' disease. A rapid haemagglutination test for special use in blood banks and epidemiological studies. *Vox Sanguinis*, v. 18, n.3, p.280-6. 1970.

KRIEGER, M. A.; ALMEIDA, E.; OLEMAN, W.; LAFAILLE, J. J.; PEREIRA, J. B.; KRIEGER, H.; CARVALHO, M. R.; GOLDENBERG, S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas'disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.46, n.4, p. 427-434. 1992.

LA FUENTE, C.; URJEL, R.; DARRAS, C.; SAUCEDO, E. 1985. Uso de tubos de microhematocrito par el diagnostico rapido de la enfermedad de Chagas y Malaria. *Annales de La Société Belge de Médecine Tropicale*, v. 65 (Suppl. 1), p.95-99, 1985.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; NAIFF, R.D. Chagas' disease in the Amazon basin; speculations on transmission *per os*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 22, n.6, p.294-297, 1980.

LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L.E.; SILVA-VERGARA, M.L.; CHIARI, E. Chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis, follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Clinical Infectious Diseases*, v.34, n. 1, p.118-123, 2002.

LEWIS, M. D.; MA, J.; YEO, M.; CARRASCO, H. J.; LLEWELLYN, M. S.; MILES, M. A. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 81(6), p. 1041-1049, 2009.

LUGONES, H.S. *Enfermedad de Chagas. Diagnóstico de su faz aguda*. 1^a edição. Republica Argentina: Ediciones Universidad Católica de Santiago Del Estero, 90p, 2001.

LUMSDEN, W.H.R.; KIMBER, C.D.; EVANS, D.A.; DOIG, S.J. *Trypanosoma brucei*: miniature anion-exchange centrifugation technique for detection of low parasitaemias: adaptation for field use. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.73, n.3, p.312-317, 1979.

LUQUETTI, A.O.; RASSI, A. *Diagnóstico Laboratorial da Infecção do Trypanosoma cruzi*. In: Brener, Z; Andrade, Z, A; Barral-Neto, M. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.344-378, 2000.

LUZ, Z.M.P.; COUTINHO, M.G.; CANÇADO, J.R.; KRETTLI, A.U. Hemocultura: técnica sensível na detecção de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.27, p.134-8. 1994.

MAECKELT, G.A. A Modified Procedure of Xenodiagnosis for Chagas' disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.13, p.11-15, 1964.

MAIA DA SILVA, F.; RODRIGUES, A.A.C.; CAMPANER, M.; TAKATA, C.S.; BRIGIDO, M.C.; JUNQUEIRA, A.C.; COURAS, J.R., TAKEDA, G.F., SHAW, J.J., TEIXEIRA, M.M. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma rangeli* and allied species from human, monkeys and other sylvatic mammals of the Brazilian Amazon disclosed a new group and a species-specific marker. *Parasitology*, v.128, n.3, p. 283-294, 2004.

MAIA DA SILVA, F.; NOYES, H.; CAMPANER, M.; JUNQUEIRA, A.C.V.; COURAS, J.R.; AÑES, N.; SHAW, J.J.; STEVENS, J.R.; TEIXEIRA, M.M.G. Phylogeny and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographic origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology*, v.129, p. 549-561, 2004.

MILES, M.A.; TOYE, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, p.217-225, 1977.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; PÓVOA, M.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, v.272, p.819-821, 1978a.

MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; PÓVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 74, p. 221-237, 1980.

MÜHLPFORDT, H. Vergleichende Kinetoplast Morphologie verschiedener Trypanosomenarten unter besonderer Berücksichtigung von *Trypanosoma cruzi*. *Tropenmed Parasitol*, v.26, p.239-246, 1975.

NERY-GUIMARÃES, F.; SILVA, N.N.; CLAUSSELL, D.T.; DE MELLO, A.L.; RAPONE, T.; SNELL, T.; RODRIGUES, N. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrida em Teutônia (Estrela-Rio Grande do Sul). *Hospital*, v. 73, p.73-110, 1968.

NEVES, V.C.; OLIVEIRA, D.L.; MOREIRA, C.J.C.; COURAS, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V. Detecção qualitativa de DNA de *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos avaliando diferentes protocolos de extração. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41 (Suppl I), p.193, 2008.

NEVES, V.C. Avaliação de protocolos de extração de DNA empregados na detecção de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 por PCR em triatomíneos. 162 p. (dissertação de mestrado)- Instituto Oswaldo Cruz- Rio de Janeiro, 2010.

NICOLLE, P.; WOFF, M. L. Researches sur la nutrition des réduvidés hémophages III- Alimentation artificielle de *Triatoma infestans* Klug au moyen de sang défibriné hémolysé. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, v.36, p.154-167, 1943.

OLIVEIRA, L R; ASSIS, L L T; MALTOS, A L; CALI, M C F R; MORAES-SOUZA, H. Reativação da doença de Chagas com envolvimento do sistema nervoso central durante tratamento de linfoma não Hodgkin. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 32(3):269-272; 2010.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (OPS) *Informe de la consulta sobre enfermedad de Chagas congénito, su epidemiología Y manejo*. Montevideo, 2004 (OPS/DPC/CD/301/04).

PANAMERICAN HEALTH ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Manual for the microscopic diagnosis of malaria*. 3^oed. (S.1.), (Scientific Publication, n°161), 1968.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A.; MOREIRA, C.J.C. In vivo differentiation of *Trypanosoma cruzi*-1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 89, n. 4, p. 603-618, 1994.

PESSOA, S.B. Domiciliação dos triatomíneos e epidemiologia da doença de Chagas. *Arquivos Higiene e Saúde Pública*, v.27, n.9, p.161-171, 1962.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. *Trypanosomidae - Gênero - Trypanosoma. Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi e Moléstia de Chagas*. In: PESSOA, S.B. *Parasitologia Médica*. 9.^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 141-84, 1974.

PESSOA, S.B.; MARTINS, A.V. *Trypanosoma rangeli* In: PESSOA, S.B. *Parasitologia Médica*. 9.^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.185-190, 1974.

PINEDA, J.A.P. Estudo comparativo entre o Xenodiagnóstico Artificial e Natural na Fase Crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.30, n.4, p.349-350, 1997.

PINTO, A.Y.N.; HARADA, G. S.; VALENTE, V.C.; ABUD, J.E.A.; GOMES, F.S.; SOUZA, G.C.R.; VALENTE, S. A. S. Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 5, p. 413-419, 2001.

PRATA, A. Prognóstico e Complicações da Doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina*, v. 5, p. 87-96, 1959.

PRATA, A. *Formas clínicas*. In: Cançado JR (Ed). Doença de Chagas. Belo Horizonte; 1^a ed. Minas gerais: Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. p.344-358.

RAMIREZ, L. P.; FERREIRA, M.S.; SARTORI, A.M.C.; NUNES, E. V.; BURGARELLI, K.; YASUDA, M.A.S.; LIMA, J.; CRUZ, A. M.; OLIVEIRA- JUNIOR, O.C.; GUILHERME, C.S.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; TOLEZANO, J. E. 1996. *Xenodiagnosis in chronic Chagas disease and in co-infection with HIV in Brazil*. In: XIVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 1996, Nagasaki (Japão). Abstracts of the XIVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Nagasaki : Showado Printings, p. 353, 1996.

RELATÓRIO TÉCNICO/ TECHNICAL REPORT DA REUNIÃO INTERNACIONAL SOBREVIGILÂNCIA E PREVENÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS NA AMAZÔNIA. Implementação da Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da doença de Chagas na Amazônia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, n.1, p. 82-89, 2005.

RELATÓRIO TÉCNICO/TECHNICAL REPORT DA 2^a REUNIÃO DA INICIATIVA INTERGOVERNAMENTAL DE VIGILÂNCIA E PREVENÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS NA AMAZÔNIA. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.39, n.3, n. 311-317, 2006.

RELATÓRIO TÉCNICO/ TECHNICAL REPORT DA CONSULTA TÉCNICA EM EPIDEMIOLOGIA, PREVENÇÃO E MANEJO DA TRANSMISSÃO DA DOENÇA DE CHAGAS COMO DOENÇA TRANSMITIDA POR ALIMENTOS. In: *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 39, n.5, p. 512-514, 2006.

REY, L. *Parasitologia*. 3^a ed. [S.I.]: Guanabara Koogan, p. 856, 2001.

ROCHA E SILVA, E.O.; PATTOLI, D.B.G.; CORREA, R.R.; ANDRADE, J.C.R. Observações sobre o encontro de tripanossomatídeos do gênero *Blastocritidida*, infectando naturalmente triatomíneos em insetário e no campo. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, v.11, p. 87-96, 1977.

RUTLEDGE, L.C.; WARD, R. A.; GOULD, D.J. Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosquito News*, v.24, n.4, p.407-419, 1964.

SANTOS, E O; CANELA, J R; MONCAO, H C G; ROQUE, M J G. Reactivation of Chagas' disease leading to the diagnosis of acquired immunodeficiency syndrome. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 6(6): 317-321, 2002.

RUSSOMANDO, G.; FIGUEIREDO, A.; ALMIRÓN, M.; SAKAMOTO, M.; MORITA, K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n.11, p.2864-2868, 1992.

SARTORI, A. M. C. ; LOPES, M. H. ; CARAMELLI, B. ; DUARTE, M. I. S.; PINTO P. L. S.; AMATO, V. A.; YASUDA, M. A. S. Simultaneous Occurrence of Acute Myocarditis and Reactivated Chagas Disease in a Patient with AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, 21 (21): 1297-1299, 1995.

SARTORI, A M C ; YASUDA, M A S; AMATO Neto, V ; LOPES, M H. Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infection and chronic Chagas disease with reactivation of Chagas disease causing cardiac disease in three. *Clinical Infectious Diseases*, 26:177-179, 1998.

SARTORI, A M C. ; LOPES, M H. ; BENVENUTTI, L A ; CARAMELLI, B ; PIETRO, A O; NUNES, E V; RAMIREZ, L P; YASUDA, M A S. Reactivation of Chagas in an HIV-infected patient leading to severe heart disease. The finding of *T. cruzi* in the direct microscopic examination of blood could be a late finding. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(5): 784-786, 1998.

SARTORI, A.M.C.; ELUF NETO, J.; NUNES, E.V.; BRAZ, L.M.A.; CAIAFFA-FILHO, H.H.; OLIVEIRA Jr., O.C.; AMATO NETO, V.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, p.872-875, 2002.

SCHAUB, G.A. *T. cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *T. infestans*. *Experimental Parasitology*, v. 68, p. 260-273, 1989.

SCHENONE, H.; ALFARO, E.; REYES, H. Rendimiento del xenodiagnóstico en las formas aguda y congénita de la enfermedad de Chagas. *Boletín Chileno de Parasitología*, v.24, p.105-106. 1969.

SCHENONE, H.; ALFARO, E.; ROJAS, A. Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica humana. *Boletín Chileno de Parasitología*, v.29, p.24-26, 1974.

SILBER, A.M.; BÚA, J.; PORCEL, B.M.; SEGURA, E.L.; RUIZ, A.M. *Trypanosoma cruzi*: Specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Experimental Parasitology*, v.85, p. 225-32, 1997.

SHAW, J.; LAINSON, R.; FRAIHA, H. Considerações sobre a epidemiologia dos primeiros casos autóctones de Doença de Chagas registrados em Belém, Pará, Brasil. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, v.3, n.2, p.153-157, 1969.

SHIKANAI-YASUDA, M.A.; BRISOLA MARCONDES, C.; GUEDES, L.A.; SIQUEIRA, G.S.; BARONE, A.A.; DIAS, J.C.P.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J.E.; PERES, B.A.; ARRUDA Jr., E.R.; LOPES, M.H.; SHIROMA, M.; CHAPADEIRO, E. Possible oral transmission of acute Chagas disease in Brasil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.33, n.5, p.351-357, 1991.

SILVA, N.N.; CLAUSSEL, D.T.; NÓLIBOS, H.; DE MELLO, A.L.; OSSANAI, J.; RAPONE, T.; SNELL, T. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.10, n.5, p.265-276, 1968.

SILVEIRA, A. C. *Guia para a vigilância epidemiológica da doença de Chagas na Região Amazônica e sua implantação*. Brasília, DF. Organização Pan-Americana da Saúde, 14 p, 2006.

SILVEIRA, A.C.; SANCHES, O. *Guia para amostragem aplicada a atividades de vigilância e controle vetorial da doença de Chagas*. Brasília, DF. Organização Pan-Americana da Saúde, 40 p, 2006.

SILVEIRA, F.J.; UMEZAWA, E.S.; LUQUETTI, A.O. Chagas' disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in Parasitology*, v. 17, n.6, p. 286-291, 2001.

SIMONS, A. *Technical Hematology*. Philadelphia & Toronto: J.B. Lippincott Company, 476 p, 1976.

SOUZA, A. S.; BORGES-PEREIRA, J.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S.S. Modelos preditivos de disfunção sistólica moderada ou grave na doença de Chagas baseados em dados clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos. *Revista Brasileira de Ecocardiografia*, v. 14, n.3, p. 63-71, 2001.

SOUZA, M.A. Morphobiological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other Trypanosomes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.94 (Suppl. I) p. 205-210, 1999.

SOUZA, M.A. Biologia e taxonomia de tripanosomatídeos. *Apostila do Curso de Pós-graduação em Biologia Parasitária*. Rio de Janeiro: IOC-FIOCRUZ, 57 p. 2000.

STORINO, R.A.; JÖRG, M.E. Experiencia en Argentina de mecanismos alternativos de transmisión de la enfermedad de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.30 (Suppl. I), p. 23-27, 1997.

STROUT, R.G. A method for concentrating hemoflagellates. *The Journal of Parasitology*, v.48, n.1, p. 100. 1962.

TEIXEIRA, A. R. L.; MONTEIRO, P.S.; REBELO, J.M.; ARGAÑARAZ, E.R.; VIEIRA, D.; LAURIA-PIRES, L.; NASCIMENTO, R.; VEXENAT, C.A.; AULT, S.K.; COSTA JM. Emerging Chagas disease: Trophic network and cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* from palm trees in the Amazon. *Emerging Infectious Disease*, v.7, n.1, p.100-112, 2001.

TEJERA, E. Un nouveau flagelle de *Rhodnius prolixus*, *Trypanosoma* (ou *Critidium*) *rangeli* n. sp. *Bulletin of the Exotic Pathology Society*, v.13, p. 527-530, 1920.

TOYÉ, P.J. Isoenzyme variation in isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 68, p.147. 1974.

UMEZAWA, E.S.; SILVEIRA, J.F. Serological Diagnosis of Chagas Disease with Purified and Defined *Trypanosoma cruzi* Antigens. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.94 (Suppl.I), p. 285-288, 1999.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; REIS, D.A.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; TOSTES Jr, S.; MOREIRA, M.C.V.; BRASILEIRO FILHO, G.; PENA, S.D.J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *American Journal of Pathology*, v.156, n.5, p. 1805-1809, 2000.

VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; FRAIHA NETO, H. Transmissão da doença de Chagas: como estamos? Considerações sobre a epidemiologia e transmissão da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 25 (Suppl. 2), p. 51-5, 1999.

VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C.; FRAIHA NETO, H. Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas'disease in the Brazilian Amazon. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94 (Suppl. 1), p. 395-398, 1999.

VALENTE, S.A.S.; PIMENTEL, O.S.; VALENTE, V.C. Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém. Primeiro registro no oeste do Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.34, (Suppl. I), p. 19-20. 2001.

VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.S.; PINTO, A.Y.N. Perfil parasitológico e sorológico em .microepidemia familiar de doença de Chagas em Abaetetuba, Estado do Pará. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34 (Suppl. I), p.20-21. 2001.

VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C. 2005. *Estudo Experimental da Viabilidade do Trypanosoma cruzi no Açaí e Infecção em Camundongos*. In: XL CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL - I ENCONTRO DE MEDICINA TROPICAL DO CONE SUL, 2005, Florianópolis/SC. Estudo Experimental da Viabilidade do *Trypanosoma cruzi* no Açaí e Infecção em Camundongos, v. 38. p. 341-341, 2005.

VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C. ; PINTO, A. Y. N. ; CÉSAR, M.J.B.; SANTOS, M.P.; MIRANDA, C.O.S ; CUERVO, P. ; FERNANDES, O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, p. 291-297, 2009.

VALLEJO, G.A.; GUHL, F.; CHIARI, E., MACEDO, A.M. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Tropica*, v. 72, p.203-212, 1999.

VARGAS, N.; SOUTO, R.P.; CARRANZA, J.C.; VALLEJO, G.A.; ZINGALES, B. Amplification of a Specific Repetitive DNA Sequence for *Trypanosoma rangeli* Identification and Its Potential Application in Epidemiological Investigations. *Experimental Parasitology*, v.96, p. 147-159, 2000.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bulletin of the World Health Organization*, v.53, n.1, p. 55-65, 1976.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, v.17, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* v.18, p. 6531-6535, 1990

WOO, P.T.K. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Canadian Journal of Zoology*, v.47, p.921-923, 1969.

WOO, P.T.K.; ROGERS, D.J. A statistical study of the sensitivity of the haematocrit centrifuge technique in the detection of trypanosomes in blood. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.68, n.4, p.319-326, 1974.

____ WHO-World Health Organization, *Control of Chagas disease*, WHO Technical report series 811, Geneva, 95 pp, 1991.

____ WHO-World Health Organization, *Control of Chagas disease*, WHO Technical report series 905, Geneva, 117 pp, 2002.

WHO, how, what and where? *Nature Outlook*, v. 465, n. 7301, p. 58-59, Jun. 2010.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; E. CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; AG SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* *intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.104, n.7, p. 1051-1054, 2009.

1. MORFOMETRIA DO *Trypanosoma cruzi*

É o procedimento técnico onde são mensuradas, em centímetros ou milímetros, as imagens desenhadas das formas evolutivas do *T.cruzi*. Esse desenho é efetuado a partir da imagem real do parasita, vizualizada ao microscópio óptico, projetada sobre o papel, utilizando-se uma câmara clara acoplada ao microscópio (Figura 1A). Após efetuar o desenho, as medidas são feitas com o auxílio de régua ou curvímetro. O curvímetro é um aparelho utilizado para as mensurações no papel (Figura 1B).

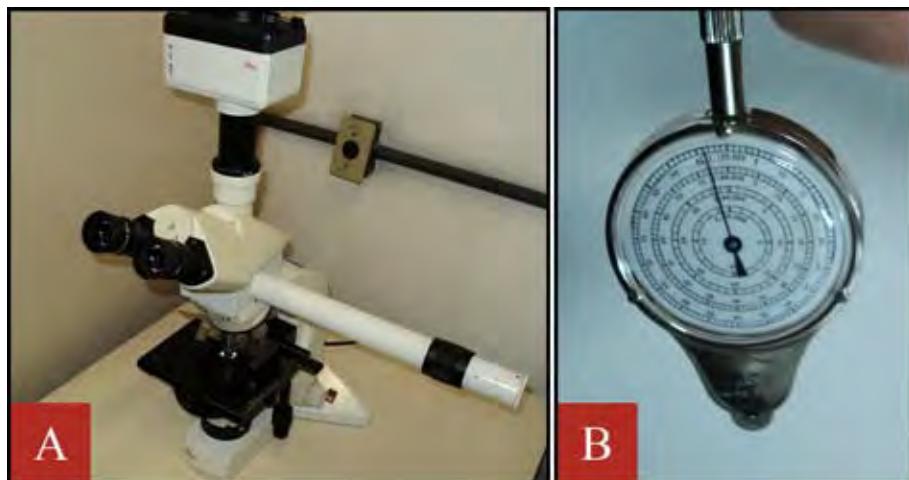


Figura 1: A) Microscópio óptico com câmara clara acoplada; B) curvímetro.

Fotos de Carlos José de Carvalho Moreira.

Antes do iniciar os desenhos, é necessário estabelecer a escala para mensuração e para isso será necessária a aquisição de uma lâmina micrométrica. Ao observarmos a lâmina micrométrica, ao microscópio óptico, verificamos que na mesma existem vários traços, ou seja, uma escala maior de 1 mm com subdivisões maiores de 0,1mm e subdivisões menores de 0,01 mm, que seria o mesmo que 1000 μm com subdivisões de 10 μm (Figura 2).

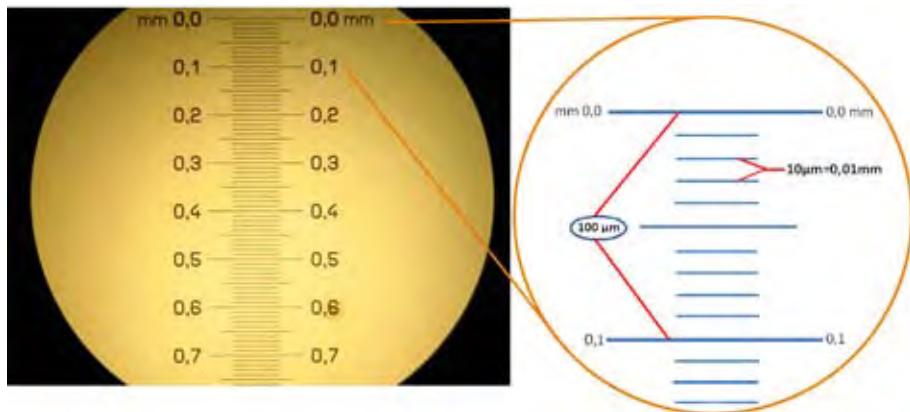


Figura 2: Fotografia da lâmina micrométrica e esquema mostrando as divisões de 10 micrômetros.

Fotografia e esquema por Carlos José de Carvalho Moreira.

Estes traços, que representam o segmento da escala da lâmina micrométrica, serão projetados, com auxílio de uma câmara clara, sobre o papel onde será realizado o desenho. Ao fazer a projeção sobre papel, traçar, uma linha reta equivalente a 10 µm, baseando-se sempre na escala de uma lâmina micrométrica e medir posteriormente com uma régua para ver a medida em milímetros.

Ao fazer a correlação entre os valores da escala da lâmina micrométrica e o correspondente quando essa escala é projetada sobre o papel e medida em mm, torna-se possível aferir o tamanho do parasita a partir dos desenhos que serão efetuados sobre o papel (Figura 3), na etapa seguinte. Dividindo-se o valor medido no papel pelo valor referente na lâmina micrométrica temos o fator de correção, que representa a ampliação da imagem no papel (aumento em relação ao tamanho real).

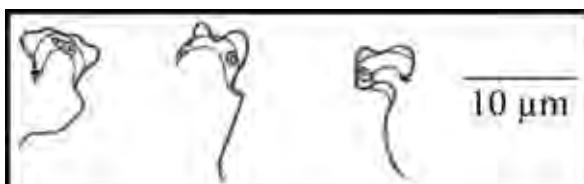


Figura 3: Desenhos de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Fonte: Junqueira, CVI, 2005 (tese de doutorado).

Após o desenho, deverá ser feita a mensuração percorrendo o curvímetro pela parte mediana do parasita de acordo com o segmento de interesse. O desenho abaixo (Figura 4) apresenta as diferentes medidas morfométricas possíveis.

A medida obtida no curvímetro (mm) será então comparada com o traço desenhado no papel, o qual representa a imagem da escala da lâmina micrométrica. A partir da mensuração pelo curvímetro podemos calcular o tamanho real de qualquer parasita desenhado dividindo-se o valor obtido pelo fator de correção.

Exemplo:

Considerando, por exemplo, que a medida de 10 micrômetros traçada no papel tenha 25 mm podemos calcular o fator de correção dividindo 25 mm por 0,01mm (10 micrômetros). O fator de correção será 2.500 (25 mm ÷ 0,01), ou seja, o desenho no papel estará aumentado 2.500 vezes. Para calcular o tamanho real de um outro parasita que tenha no papel 30 mm de comprimento, teremos que dividir 30 por 2500, nesse caso 0,012mm (12 micrômetros).

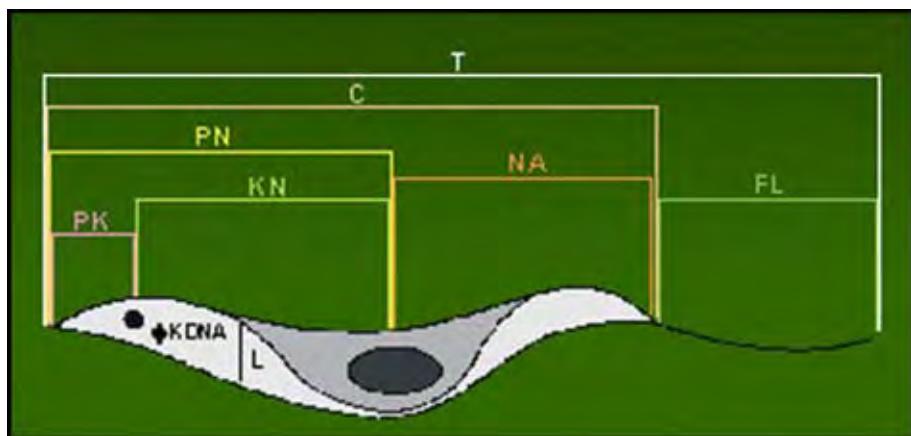


Figura 4: Esquema com as diferentes medidas morfométricas.

Fonte: Junqueira, CVJ, 2005 (tese de doutorado).

Abreviações:

- C *comprimento de corpo sem o flagelo livre*
 FL *comprimento do flagelo*
 PN *distância que vai da extremidade posterior ao meio do núcleo*
 L *largura do corpo (sem membrana ondulante)*
 NA *distância do meio do núcleo a extremidade anterior*
 T *comprimento do corpo incluindo o flagelo*
 PK *distância que vai da extremidade posterior ao meio do cinetoplasto*
 KN *distância do meio do cinetoplasto ao meio do núcleo*
 Ø kDNA *diâmetro do cinetoplasto*

A tabela abaixo demonstra as mensurações de diferentes índices morfométricos de uma lâmina de *Trypanosoma cruzi* feita a partir de uma lâmina, corada com Giemsa, confeccionada com uma amostra de sangue de gambá.

Tabela 1: Mensurações de diferentes índices morfométricos de uma lâmina de *Trypanosoma cruzi*.

Medidas e Índices Tomados	Lâmina n°_0 Prancha n°_____	Flageladas Visualizadas no Sangue de um Novo Moinho												
	Flagelado n°_1	Flagelado n°_1 (2)	Flagelado n°_1	Flagelado n°_1	Flagelado n°_2	Flagelado n°_1	Flagelado n°_1	Flagelado n°_1	Flagelado n°_1	Flagelado n°_3	Flagelado n°_1	Ma	Me	Média
C	19,6	16	46	15,2	18	14	16,0	15,2			48	14	31	
FL	5,8	14	4,8	6	10	9,2	11,2	8,8			14	4,8	16,4	
L	1,38	1,24	5,17	2,41	1,52	2,41	2,14	1,72			5,17	1,24	3,2	
PN	10	10	20,0	10	10,4	10	12	10,4			2,8	10	15,4	
NA	9,6	5	27,2	5,0	7,6	4	4,6	4,8			9,6	4	6,6	
IN (PN/NA)	1,04	1,67	0,76	1,90	1,37	3,5	3,5	2,17			2,5	1,04	1,77	
T	24,9	30	52,8	21,2	38	23,2	38	34			52,8	21,2	37	
PK	1,45	1,03	16,8	3,07	1,72	1,38	1,88	1,34			16,8	1,03	8,9	
KN	8,5	9,97	4	7,9	6,7	8,62	10,14	9,16			10,14	4	7,07	
Ø kDNA	0,69	0,76	0,76	0,63	0,76	0,76	0,76	0,63			0,93	0,69	0,76	
	19,03	Gambá												

Fonte: Junqueira, CVJ, 2005 (tese de doutorado).

2. MORFOLOGIA DAS FORMAS EPIMASTIGOTA E TRIPOMASTIGOTA DO *T. cruzi*

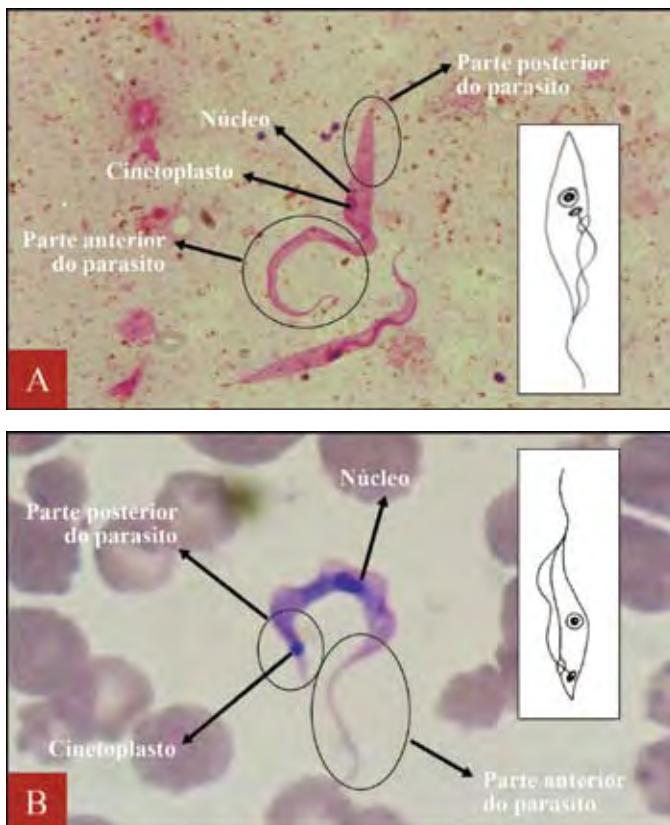


Figura 5: Morfologia de uma forma epimastigota (A) e de uma forma triomastigota (B).

Fotos de Carlos José de Carvalho Moreira. / Desenhos adaptados por Carlos José de Carvalho Moreira e Angela C. V. Junqueira. / Fonte: site <http://webs.cb.uga.edu/~striepen/medpara/tryps3.ppt>

2.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS do *T. cruzi* E DO *T. rangeli*

Formas tripomastigotas de *T. cruzi*, em lâminas de sangue de indivíduos com suspeita de malária.

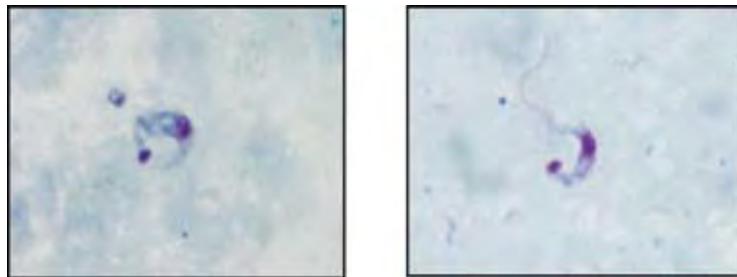


Figura 6: Morfologia de formas tripomastigotas sanguíneas.

Fotografias de Maria Celeste D. Spata e Angela C. V. Junqueira.

Formas de *T. cruzi*, em lâminas de tubo digestivo de triatomíneos infectados experimentalmente.

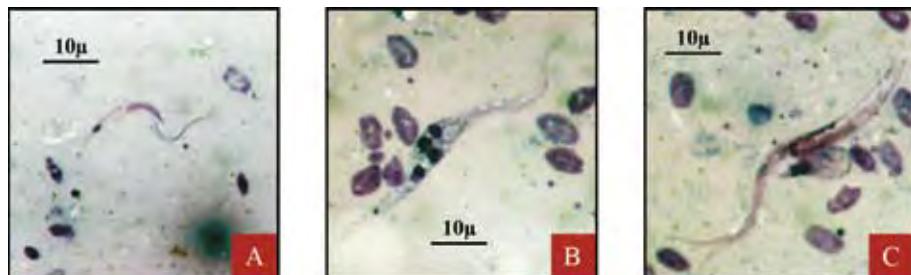


Figura 7: Morfologia de formas tripomastigota (A) e epimastigotas (B,C).

Fotografias de Maria Celeste D. Spata.

Formas de *T. rangeli*, em lâmina de sangue, glândula salivar e hemolinfa de triatomíneos infectados experimentalmente.

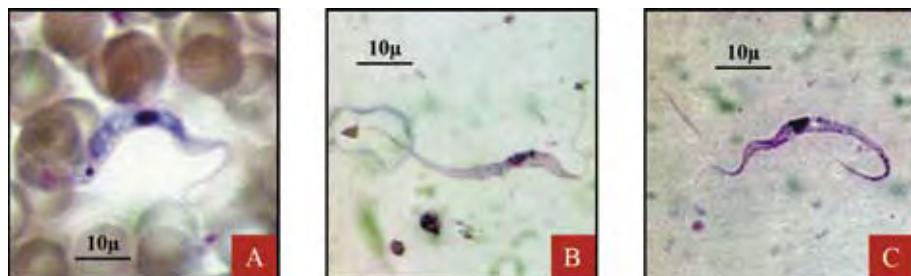


Figura 8: Morfologia de formas do *T. rangeli* no sangue (A), hemolinfa (B) e nas fezes (C).

Fotografias de Maria Celeste D. Spata.

Tabela 2: Diagnóstico diferencial entre *T. rangeli* e *T. cruzi* pela morfologia, no vertebrado, no vetor e em meio de cultura.

Parâmetros	<i>T. rangeli</i>	<i>T. cruzi</i>
Morfologia no vertebrado		
Tamanho do cinetoplasto	Pequeno: 0,7 μm	Grande: 1,2 μm
Tamanho do parasito no sangue	Longo: 27-32 μm	Curto: 17-21 μm forma em C
Localização do cinetoplasto	Subterminal	Quase terminal
Estágio de multiplicação	Desconhecido	Amastigota nos leóides
No inseto vetor		
Local de desenvolvimento	Intestino, hemolinfa, glândula salivar	Somente no intestino
Epimastigotas	Formas finas e longas, parte posterior afilada	Forma em clava, parte posterior romba
Triponastigotas	Presentes no estômago, na hemolinfa e no intestino posterior	Presentes no intestino posterior (metacíclicos)
Metatripanossomas	Curtos (10-13 μm) Cinetoplasto terminal Presentes na glândula salivar	Longos (17-22 μm) Cinetoplasto subterminal Presentes na ampola retal
Cultura		
Meio de Warren	Não cresce	Cresce bem
Meio de Senekjie + Nistarina	Cresce bem	Não cresce

a: adaptado de Hoare (1972).

Fonte: COURA, J.R.; CARVALHO-MOREIRA, C.J.; JUNQUEIRA, A.C.V.; *Tripanossomíase rangeli*. In: *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1^o ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 685-689.

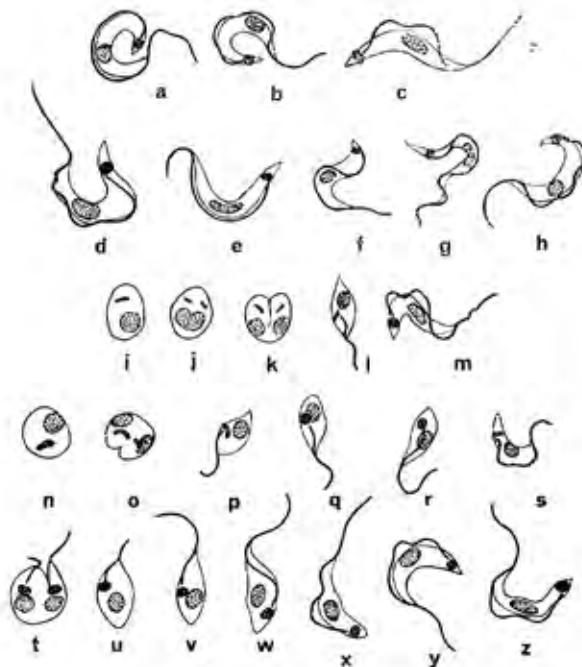


Fig. 75. *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* ($\times 1600$). a-s; From wild mammals (reservoir hosts): a-h. Blood forms; a, b, c. From Opossums; d. From Raccoon; e. From Wood-rat (= *T. triangulatus*); f, g. Broad and slender trypanosomes from Water-rat; h. From Mustelid (*Tayra*). i-s. Tissue stages (from Opossums): i-k. Amastigotes dividing; l. Epimastigote; m. Young tryponastigote; n, o. Amastigotes; p, q. Epimastigotes; r. Transitional stage; s. Young tryponastigote. (After Kofoid & McCulloch 1916; Walton *et al.* 1958; Deane 1958, 1960, 1961; Barreto & Siqueira 1962.) t-z. *T. cruzi* isolated from *Triatoma* in British Honduras, developmental stages in heart muscle of mice: t. Dividing amastigote producing flagella; u. Pyriform daughter-individual; v. Epimastigote; w. Transitional tryponastigote; x. Young blood trypanosome; y, z. Adult blood trypanosomes. (Original, redrawn from photomicrographs, by courtesy of Dr. W. B. Petana 1969.)

Figura 9: Prancha com diferentes formas do *T. cruzi*.

Fonte: HOARE, C.A. The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph. 1 ed. Oxford and Edinburgh: Blackwell 749 p. Scientific publications LTD, 1972, 749 p.

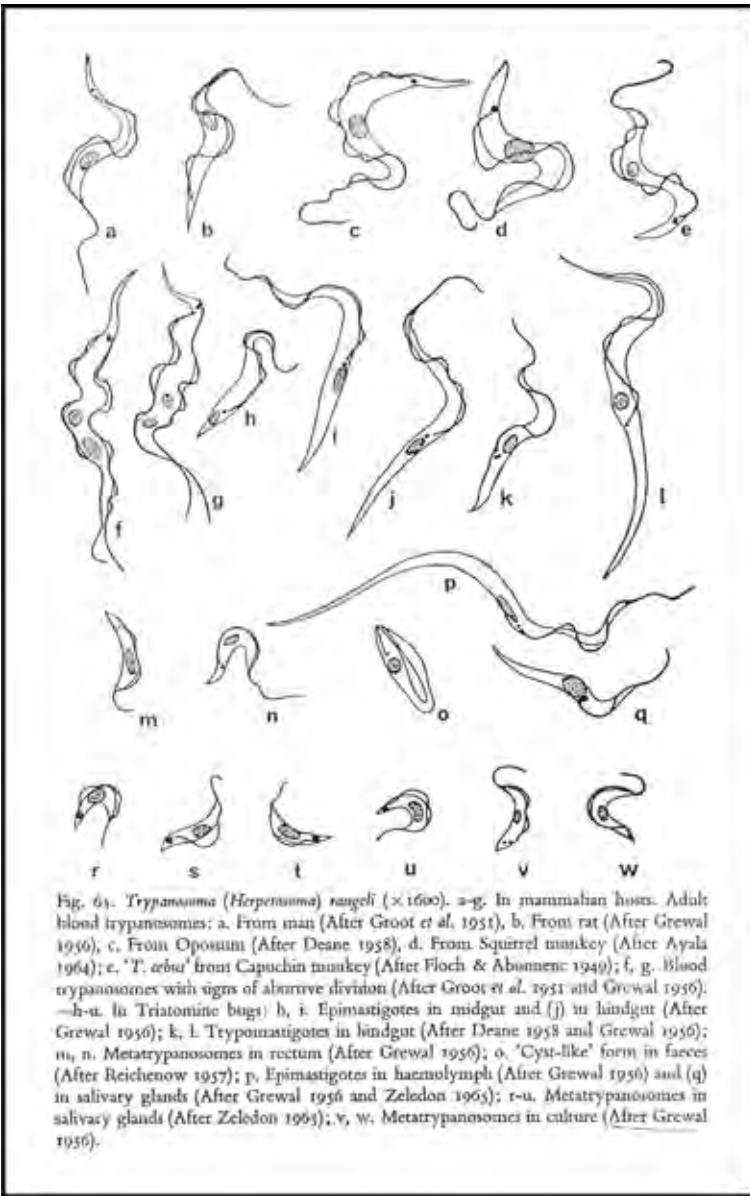


Fig. 61. *Trypanosoma (Herpetomonas) rangeli* ($\times 1600$). a-g. In mammalian hosts. Adult blood trypanosomes: a. From man (After Groot et al. 1951), b. From rat (After Grewal 1956), c. From Opossum (After Deane 1958), d. From Squirrel monkey (After Ayala 1964); e. 'T. arbu' from Capuchin monkey (After Floch & Abussem 1949); f, g. Blood trypanosomes with signs of amoeboid division (After Groot et al. 1951 and Grewal 1956). h-u. In Triatomine bugs: h, i. Epimastigotes in midgut and (j) in hindgut (After Grewal 1956); k, l. Trypomastigotes in hindgut (After Deane 1958 and Grewal 1956); m, n. Metatrypanosomes in rectum (After Grewal 1956); o. 'Cyst-like' form in faeces (After Reichenow 1957); p. Epimastigotes in haemolymph (After Grewal 1956) and (q) in salivary glands (After Grewal 1956 and Zeledón 1963); r-u. Metatrypanosomes in salivary glands (After Zeledón 1963); v, w. Metatrypanosomes in culture (After Grewal 1956).

Figura 10: Prancha com diferentes formas do *T. rangeli*.

Fonte: HOARE, C.A. *The Trypanosomes of Mammals: A zoological monograph*. 1 ed. Oxford and Edinburgh: Blackwell 749 p. Scientific publications LTD, 1972, 749 p.

2.2 TRIPOMASTIGOTAS ENCONTRADOS EM ESFREGAÇÕES DO SANGUE DE MACACOS-DE-CHEIRO NATURALMENTE INFECTADOS

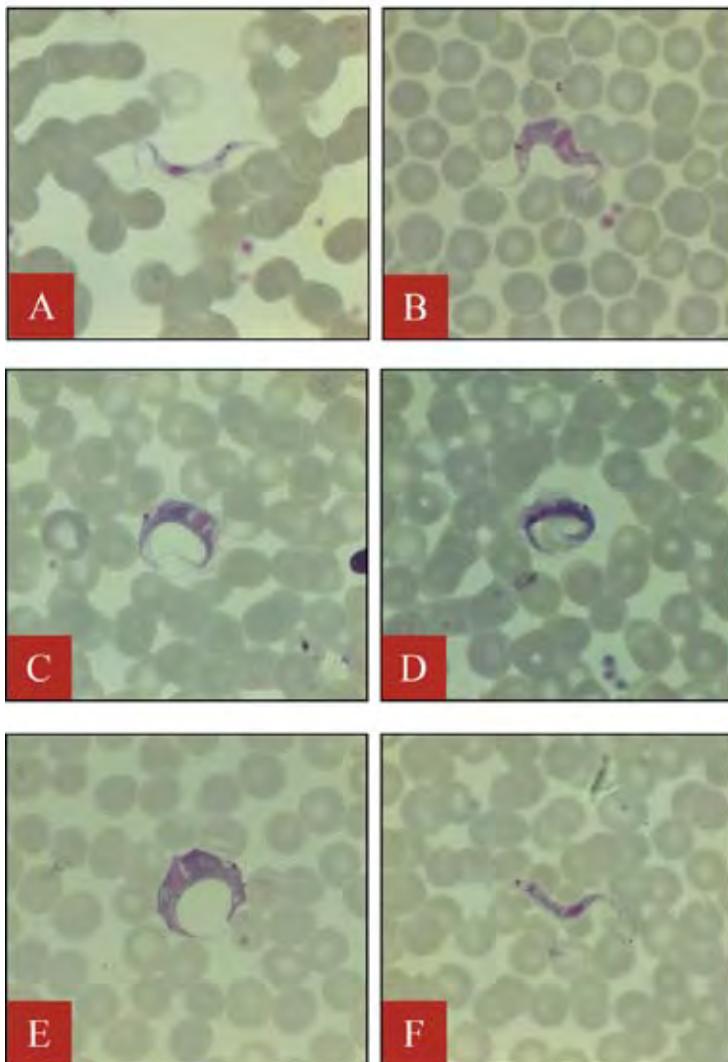


Figura 11: A e B são tripanosomas semelhantes ao *T. samirii*; C, D e E, *Trypanosoma minasense*; e F, *T. rangeli*.

Fonte: BARCELOS, M.Z.C. *Tripanosomas de Macacos-de-cheiro: o que é o Trypanosoma saimirii* Rodhain, 1941?. 1995. 100p. (dissertação de mestrado), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro.

2.3 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE FORMAS SANGUÍNEAS

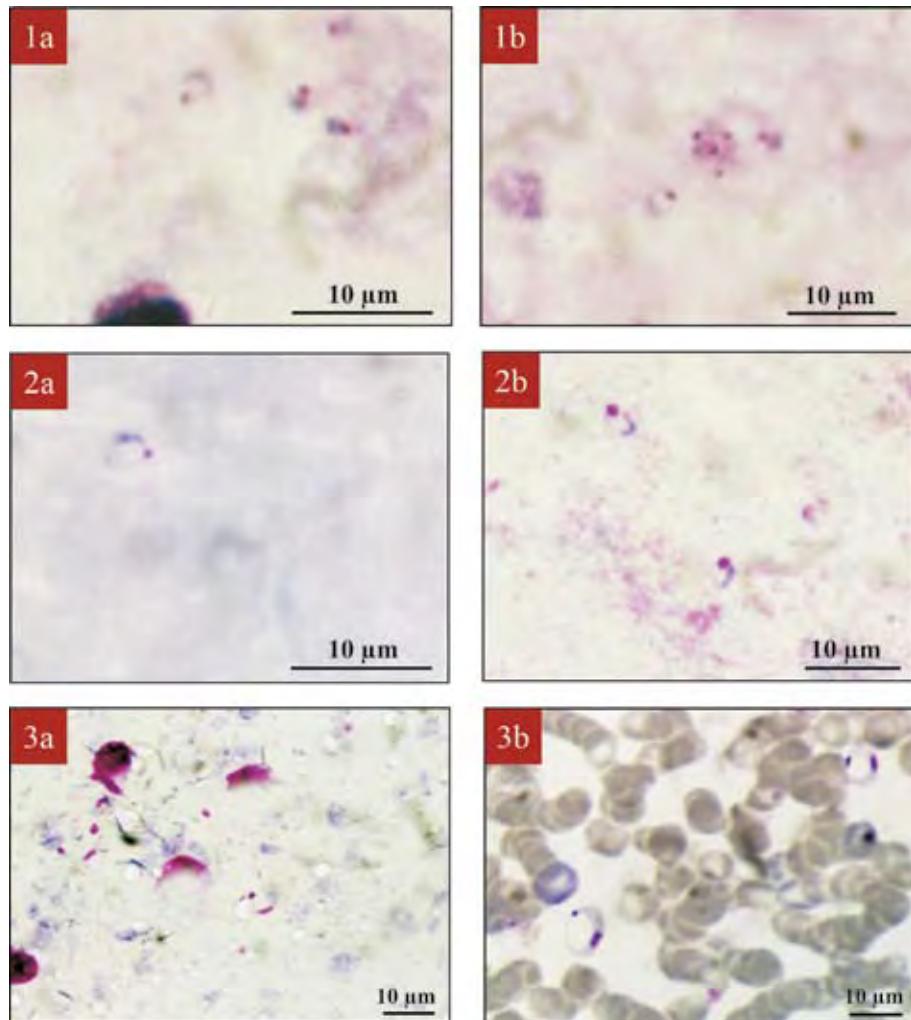


Figura 12: Formas trofozoíticas de *Plasmodium falciparum* (1a, 1b), trofozoíticas de *Plasmodium vivax* (2a, 2b) e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (3a, 3b).

Fotografias de Angela C.V. Junqueira.

4. FICHA DE NOTIFICAÇÃO DE DOENÇA DE CHAGAS AGUDA - SINAN

página 1

República Federativa do Brasil		SINAN				
Ministério da Saúde		SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO				
		Nº				
		FICHA DE INVESTIGAÇÃO DOENÇA DE CHAGAS AGUDA				
CASO SUSPEITO: - Febre prolongada (>7 dias) e quadro clínico sugestivo de DCA, na presença de dados epidemiológicos compatíveis, como: residente ou visitante de área com ocorrência de triatomíneos; ou antecedente recente de transfusão sanguínea ou transplante de órgão; ou ingestão de alimento suspeito de contaminação pelo T.cruzi; ou recém nascido de mãe infectada.						
CASO CONFIRMADO: a- Critério laboratorial: paciente com exame parasitológico direto positivo com ou sem sintomas OU sorologia positiva com anticorpos anti T. cruzi classe IgM no sangue periférico OU sorologia positiva com anticorpos da classe IgG, com alteração na concentração de pelo menos três títulos em um intervalo mínimo de 21 dias em amostras pareadas OU achados necroscópicos positivos. b- Critério clínico-epidemiológico: vínculo epidemiológico com casos confirmados de DCA em surtos da doença.						
Dados Gerais	1	Tipo de Notificação	2 - Individual			
	2	Agravos/Doença	DOENÇA DE CHAGAS AGUDA			
	3	Código (C10 ICD)	B 57.1			
	4	Data da Notificação				
	5	UF				
	6	Município de Notificação				
	7	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)				
	8	Nome do Paciente				
	9	Data de Nascimento				
	10	(OU) Idade	1 - Hora 2 - Dia 3 - Mes 4 - Ano			
11	Sexo M: Masculino F: Feminino I: Ignorado					
12	Gestante 1-1º Trimestre 2-2º Trimestre 3-3º Trimestre 4-Último gestacionário 5-Último 6- Não se aplica					
13	Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amoreira 4-Pardo 5-Indigena 6- Outro					
14	Escolaridade 0-Avulsado 1-1º a 4º série incompleta do EF (ainda presário ou 1º grau) 2-4º série completa do EF (ainda presário ou 1º grau) 3-5º a 8º série incompleta do EF (ainda presário ou 1º grau) 4-Escola fundamental completa (ainda presário ou 2º grau) 5-Ensino médio completo (ainda colegial ou 2º grau) 6-Escreve medido incompleto (ainda colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9-Ignorado 10-Não se aplica					
15	Número do Cartão SUS	16	Nome da mãe			
Dados de Residência	17	UF	18	Município de Residência	Código (IBGE)	
	19	Distrito				
	20	Bairro	21	Logradouro (rua, avenida,...)	Código	
	22	Número	23	Complemento (apto., casa,...)	24	Geo campo 1
	25	Geo campo 2	26	Ponto de Referência	27	CEP
	28	(DDD) Telefone	29	Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado	30	País (se residente fora do Brasil)
Dados Complementares do Caso						
Antecedentes epidemiológicos	31	Data da Investigação	32	Ocupação		
	33	Deslocamento (viagens para áreas infestadas até 120 dias antes do inicio dos sintomas):				
	UF	Município				
	34	Presença de Vestígios de Triatomídeos Intra-Domicílio	35	Data de encontro dos vestígios	36	História de Uso de Sangue ou Hémoderivados nos Últimos 120 Dias 1 - Sim 2 - Não 3 - Não Realizado 9 - Ignorado
	1-Sim 2-Não 3-Não Realizado 9-Ignorado				1 - Sim 2 - Não 3 - Não se Aplica 9 - Ignorado	
	37	Existência de Controle Sorológico na Unidade de Hemoterapia	38	Manipulação/Contato de Material com T. cruzi		
	1-Sim 2-Não 3-Não se Aplica 9-Ignorado		1 - Sim 2 - Não 3 - Não se Aplica 9 - Ignorado			
39	Menor ou igual a 9 meses de idade: Mãe com Infecção Chagásica	40	Possibilidade de transmissão por via oral			
1-Sim 2-Não 3-Não se Aplica 9-Ignorado		1-Sim 2-Não 3-Ignorado				

página 2

Dados Clínicos	<p>41 Sinais e Sintomas 1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado</p> <p><input type="checkbox"/> Asintomático <input type="checkbox"/> Edema de face/membros <input type="checkbox"/> Sinais de Meningoencefalite <input type="checkbox"/> Poliadenopatia</p> <p><input type="checkbox"/> Febre Persistente <input type="checkbox"/> Hepatomegalia <input type="checkbox"/> Sinais de ICC <input type="checkbox"/> Taquicardia Persistente/Arritmias</p> <p><input type="checkbox"/> Astenia <input type="checkbox"/> Espplenomegalia <input type="checkbox"/> Chagoma de inoculação/sinal de Romaña <input type="checkbox"/> Outros _____</p>			
	<p>42 Exames Realizados</p> <p>43 Parasitológico Direto 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado <input type="checkbox"/> Exame a Fresco/Gota espessa/Esfregão <input type="checkbox"/> Outro <input type="checkbox"/> Strohl/Microhematocrito/QBC</p> <p>44 Data da coleta</p> <p>45 Parasitológico Indireto 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado <input type="checkbox"/> Xenodiagnóstico <input type="checkbox"/> Hemocultivo</p>			
Dados do Laboratório	<p>46 Data da coleta S1 48 Resultado da Sorologia para ELISA IgM IgG</p> <p>1 - Reagente <input type="checkbox"/> S1 <input type="checkbox"/> IgM 2 - Não-Reagente <input type="checkbox"/> S1 <input type="checkbox"/> IgG 3 - Inconclusivo <input type="checkbox"/> S2 <input type="checkbox"/> IgM 4 - Não Realizado <input type="checkbox"/> S2 <input type="checkbox"/> IgG</p> <p>47 Data da coleta S2 49 Resultado da Hemoaglutinação IgM IgG</p> <p>1 - Reagente <input type="checkbox"/> S1 <input type="checkbox"/> IgM 2 - Não-Reagente <input type="checkbox"/> S1 <input type="checkbox"/> IgG 3 - Inconclusivo <input type="checkbox"/> S2 <input type="checkbox"/> IgM 4 - Não Realizado <input type="checkbox"/> S2 <input type="checkbox"/> IgG</p> <p>50 Resultado de Imunofluorescência Indireta - IFI IgM Títulos IgG Títulos</p> <p>1 - Reagente <input type="checkbox"/> S1 <input type="checkbox"/> 1: 2 - Não-Reagente <input type="checkbox"/> S1 <input type="checkbox"/> _____ 3 - Inconclusivo <input type="checkbox"/> S2 <input type="checkbox"/> 1: 4 - Não Realizado <input type="checkbox"/> S2 <input type="checkbox"/> _____</p>			
	<p>51 Data da coleta do Histopatológico 52 Resultado do Histopatológico (biópsia/necropsia) 1 - Positivo 2 - Negativo 3 - Não Realizado 9 - Ignorado <input type="checkbox"/></p>			
Tratamento	<p>53 Tipo de Tratamento <input type="checkbox"/> Específico 54 Drogas Utilizadas no Tratamento Específico 1 - Benznidazol 2 - Outro 55 Tempo de tratamento (em dias)</p> <p>1 - Sim 2 - Não 9 - Ignorado <input type="checkbox"/></p>			
	<p>56 Medidas Tomadas 1 - Sim <input type="checkbox"/> Controle de Triatomídeos <input type="checkbox"/> Implantação de Normas de Biossegurança em Laboratório 2 - Não <input type="checkbox"/> Fiscalização Sanitária em Unidade de Hemoterapia <input type="checkbox"/> Outros _____ 3 - Não se Aplica <input type="checkbox"/> 4 - Ignorado <input type="checkbox"/></p>			
Conclusão	<p>57 Classificação Final 58 Criterio de Confirmação/Descarte 59 Evolução do Caso 60 Data do Óbito</p> <p>1 - Confirmado <input type="checkbox"/> 1 - Laboratório <input type="checkbox"/> 1 - Viva <input type="checkbox"/> 1 - Óbito por D. Chagas Aguda 2 - Descartado <input type="checkbox"/> 2 - Clínico-Epidemiológico <input type="checkbox"/> 2 - Óbito por D. Chagas Aguda 3 - Clínico <input type="checkbox"/> 3 - Óbito por outras causas <input type="checkbox"/> 3 - Ignorado</p>			
	<p>61 Modo/Local Provável da Fonte da Infecção 62 Local Provável da Infecção (no período de 120 dias) 63 O caso é autoctone do município de residência?</p> <p>1 - Transfusional 2 - Veterinário 3 - Vertical 4 - Acidental 5 - Crural 6 - Outra <input type="checkbox"/> 3 - Ignorada 64 UF 65 País 66 Município 67 Código (IBGE) 68 Distrito 69 Bairro 70 Data do Encerramento</p> <p>1 - Sim 2 - Não 3 - Indeterminado <input type="checkbox"/></p>			
Observações				
Investigador	Município/Unidade de Saúde		Cód. da Unid. de Saúde	
	Nome		Função	
Doença de Chagas Aguda		Sinan NET		SVS 08/10/2009

Observação: Apenas a detecção do T. cruzi em amostras de sangue pelos métodos parasitológicos diretos é confirmatória de DCA.

5. PROPOSTA DE FLUXOGRAMA PARA NOTIFICAÇÃO DE CASOS DE INFECÇÃO POR *T. cruzi*

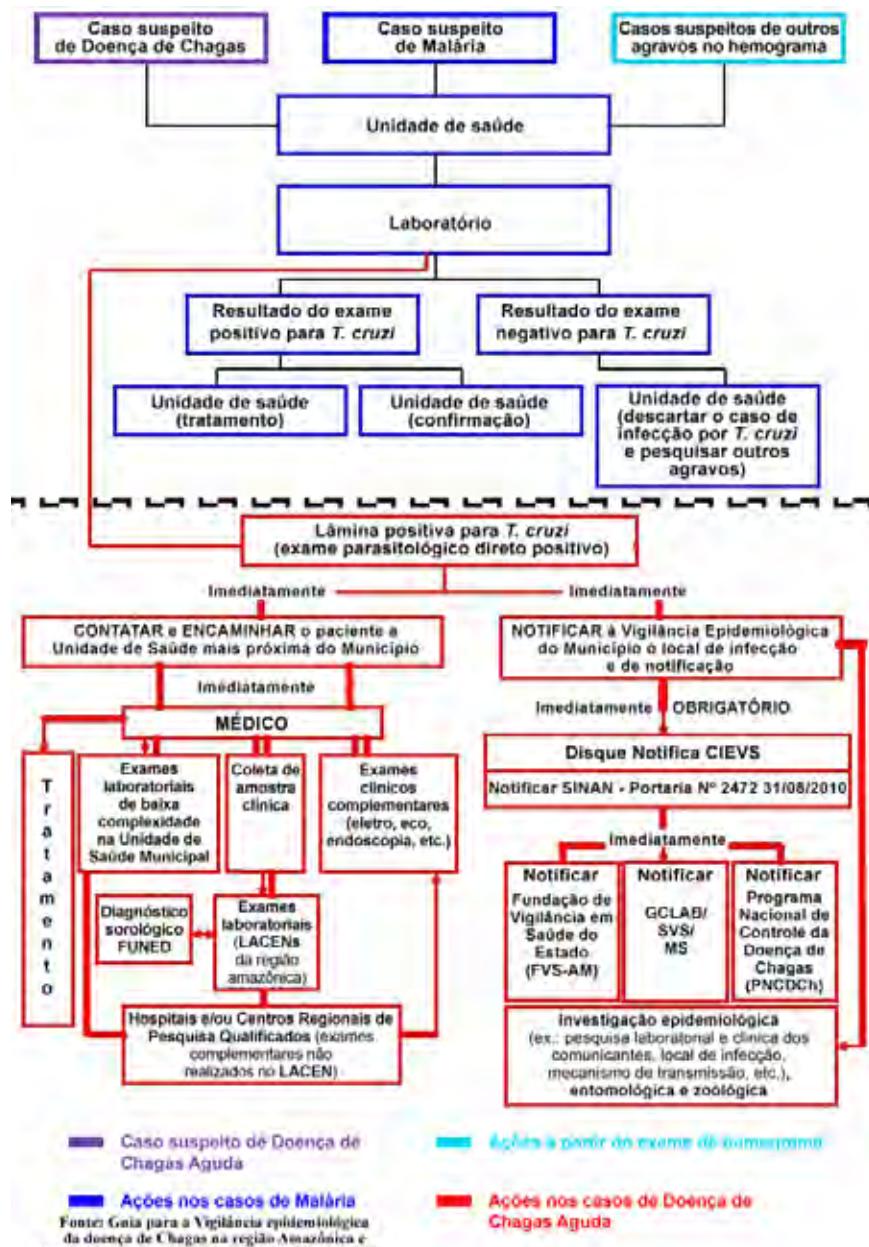


Figura 14: Fluxograma adaptado por Junqueira, A.C.V., Moreira, C.J.C. e Mamede-Oliveira, S.

6. PROPOSTA DE FLUXOGRAMA PARA NOTIFICAÇÃO DE CASOS DE INFECÇÃO POR *T. rangeli*

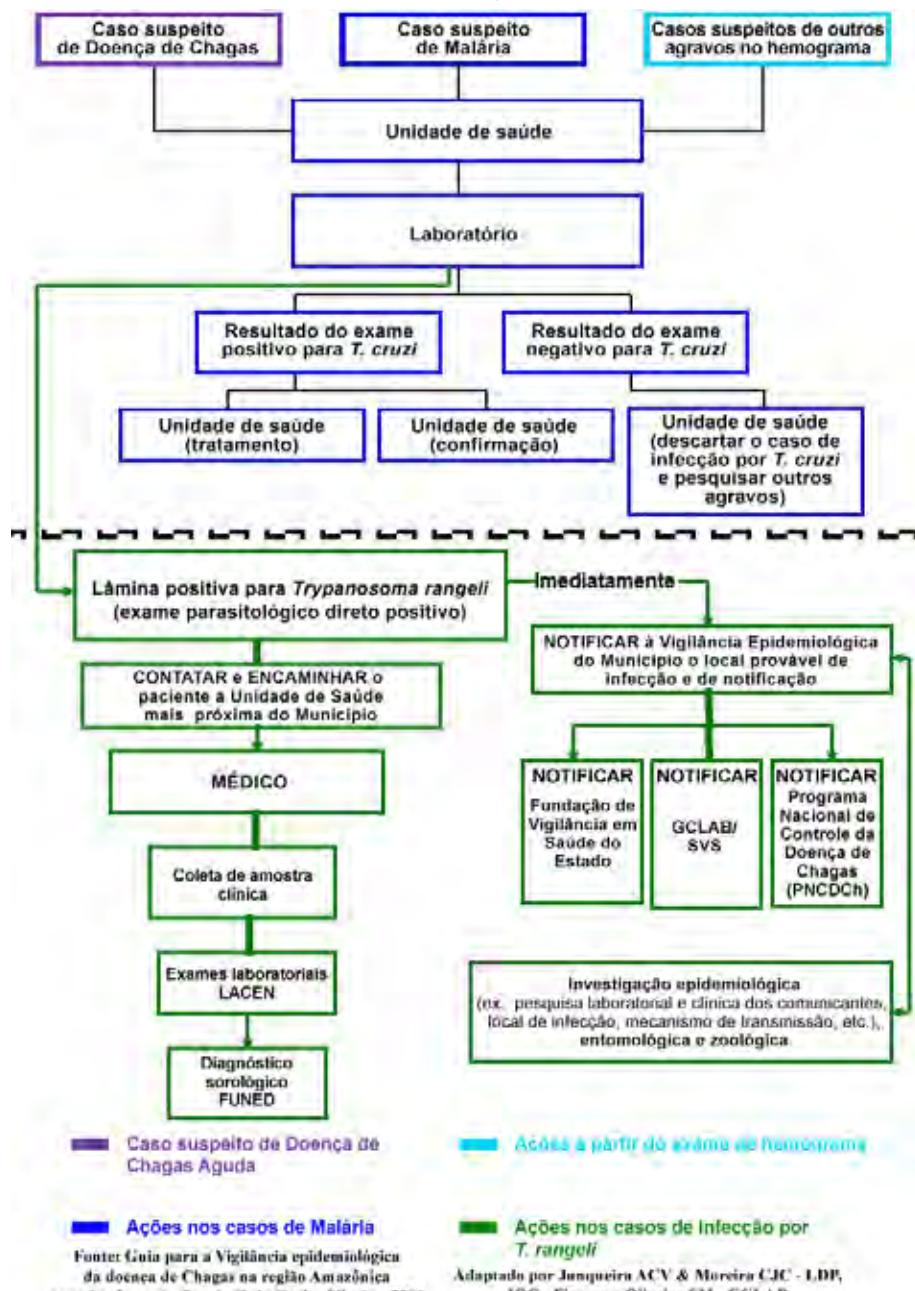


Figura 15: Fluxograma elaborado por Junqueira, A.C.V. e Moreira, C.J.C.

7. PROPOSTA DE FLUXO DE REVISÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DAS LÂMINAS COM AMOSTRAS DE SANGUE

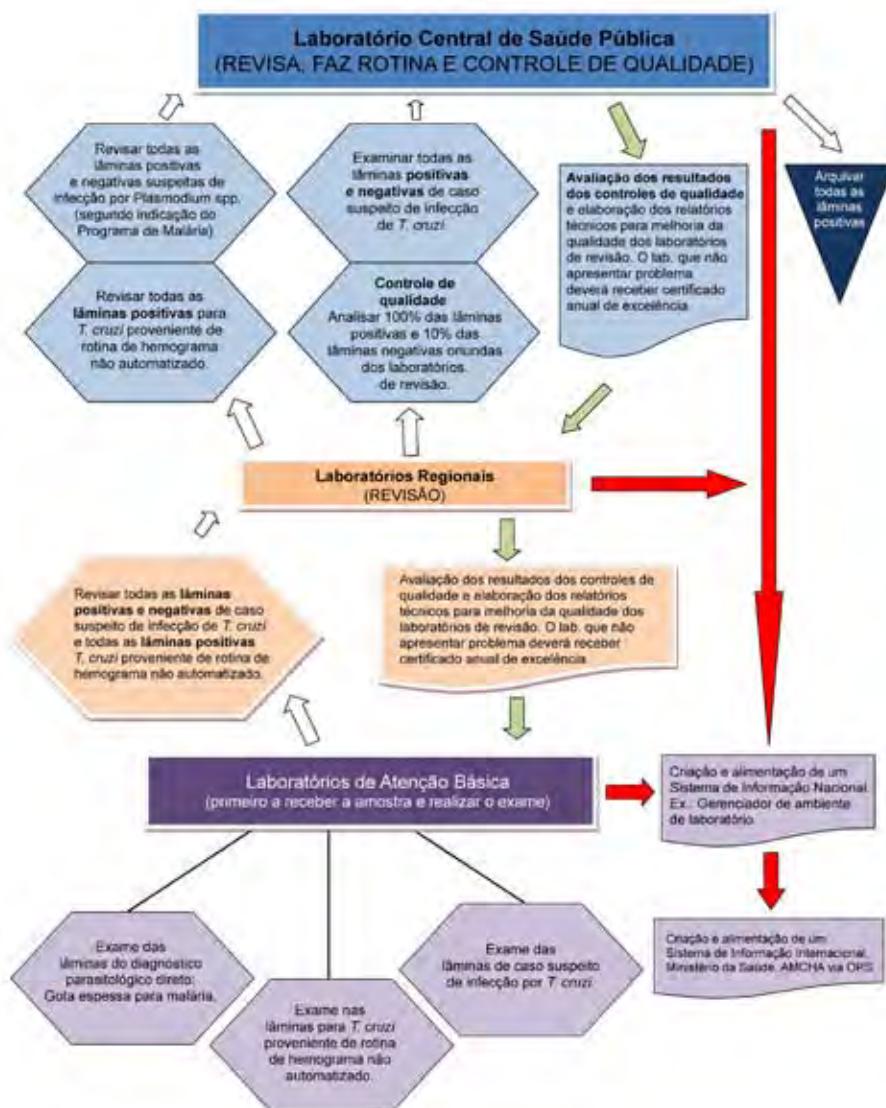


Figura 17: Fluxograma elaborado por Junqueira, A.C.V. e Mamede-Oliveira, S.

8. PROPOSTA DE FLUXOGRAMA PARA CONDUTA A PARTIR DA COLETA/CAPTURA DE TRIATOMÍNEOS

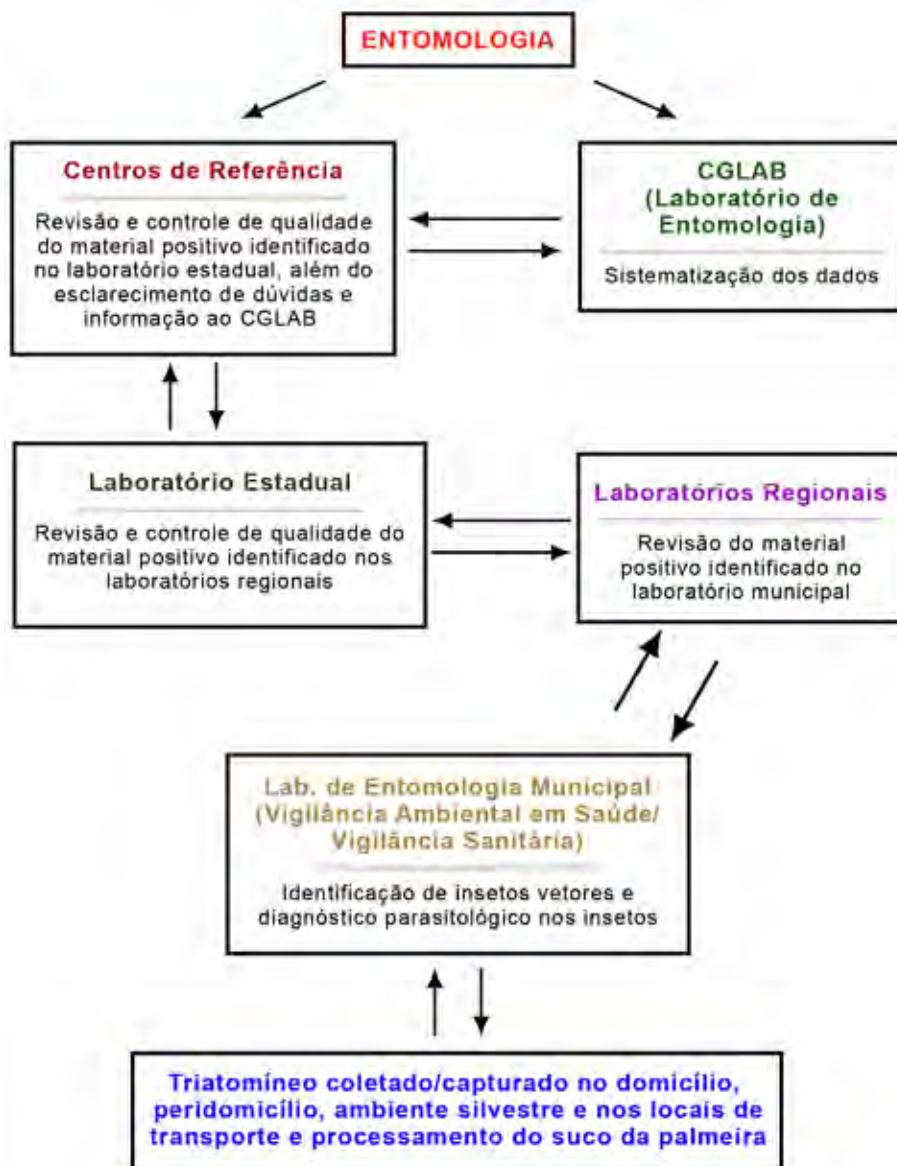


Figura 16: Fluxograma elaborado por Junqueira, A.C.V. e Giordano-Dias, C.M.

9. MÉTODO TRADICIONAL DE AVALIAÇÃO DE PARASITEMIA SEMIQUANTITATIVA (EM CRUZES) PARA MALÁRIA QUE PODE SER EMPREGADO NA CONTAGEM DO *T. cruzi*

Utilizar os mesmos critérios estabelecidos para a contagem de *Plasmodium sp.* para as lâminas onde forem detectadas formas tripomastigotas sanguíneas, enumerados abaixo:

- 1) Número de campos a examinar = 100.
- 2) Número inferior a 40 parasitos nos 100 campos examinados: anotar o número encontrado. Por exemplo: 37 formas tripomastigotas sanguíneas.
- 3) Quando o número total de parasitos contados situar-se entre 40 e 60 parasitos por 100 campos, registrar: 1/2 (meia cruz).
- 4) A partir de um parasito por campo, o resultado será registrado como uma, duas, três ou quatro cruzes, conforme a tabela a seguir (tabela 3):

Tabela 3: Avaliação semiquantitativa de parasitemia para malária.



Parasitos contados	Número de campos microscópicos	Cruzes
40 a 60	100	1/2 +
1	1	+
2-20	1	++
21-200	1	+++
+ 200	1	++++

Figura 18:
Exemplo de
Contador manual
de células.

Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE 2005. *Manual de diagnóstico laboratorial da malária (Série A. Normas e Manuais Técnicos)*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 116p.

OBS: Para a contagem ter um valor semiquantitativo é de suma importância que a lâmina contenha uma distribuição uniforme do sangue.

10. AVALIAÇÃO DA PESQUISA DE DCA NOS MUNICÍPIOS QUE TIVERAM MICROSCOPISTAS/LABORATORISTAS CAPACITADOS PARA A DETECÇÃO DE *T. cruzi* NO EXAME DIRETO

10.1 Avaliação 1 - AVALIAÇÃO ATRAVÉS DOS RESULTADOS DAS LEITURAS DAS LÂMINAS DOS MICROSCOPISTAS DE MALÁRIA

Antes de ser implantada de forma ampla a vigilância da doença de Chagas compartilhada com a vigilância da Malária na Amazônia Brasileira, como parte de um estudo piloto, estamos estudando a possibilidade de que seja avaliada junto com os responsáveis pelo Programa de Malária do Ministério da Saúde, a possibilidade de que os dados da **Ficha de Notificação/SINAN/Malária** sejam compartilhados com as seguintes informações adicionais na referida ficha:

47. Realizada pesquisa de *Trypanosoma sp.* na lâmina:

- 1.** Sim
- 2.** Não

48. Caso sim, resultado do exame:

- 1.** Negativo
- 2.** *T. cruzi* (Tc)
- 3.** *T. rangeli* (Tr)
- 4.** Infecção mista (Tc+Tr)
- 5.** Dúvida na identificação da espécie do gênero *Trypanosoma*

49. Parasitemia em cruzes*:

- 1.** < $\frac{1}{2}$ + (menor que meia cruz);
- 2.** $\frac{1}{2}$ + (meia cruz);
- 3.** + (uma cruz);
- 4.** ++ (duas cruzes);
- 5.** +++ (três cruzes);
- 6.** ++++ (quatro cruzes).

50. No caso de infecção mista (Tc+Tr) a parasitemia em cruzes:

a) ***T. cruzi***

- 1.** < $\frac{1}{2}$ + (menor que meia cruz);
 - 2.** $\frac{1}{2}$ + (meia cruz);
 - 3.** + (uma cruz);
 - 4.** ++ (duas cruzes);
 - 5.** +++ (três cruzes);
 - 6.** ++++ (quatro cruzes).
-

b) ***T. rangeli***

- 1.** < $\frac{1}{2}$ + (menor que meia cruz);
- 2.** $\frac{1}{2}$ + (meia cruz);
- 3.** + (uma cruz);
- 4.** ++ (duas cruzes);
- 5.** +++ (três cruzes);
- 6.** ++++ (quatro cruzes)

*Estimativa da densidade parasitária (vide página 132).

Através da anotação dos dados acima na Ficha de Notificação/SINAN/Malaria, será possível um aumento na notificação dos casos de doença de Chagas aguda (DCA). Essa informação seria disponibilizada para a equipe do Programa Nacional de Controle da Doença de Chagas (PNCDCh/SVS/MS) permitindo um estudo da “busca passiva” dos casos de DCA na Amazônia Brasileira. Um caso índice deverá desencadear a “busca ativa” de outros casos positivos, pois a ele podem estar associados outros tantos casos de Doença de Chagas Aguda (DCA) como de Doença de Chagas Crônica (DCC). Essa investigação deverá se iniciada, imediatamente, através da pesquisa direta dos comunicantes do caso índice.

Ressaltamos, que para que isso ocorra, a equipe do Programa de Malaria deverá ser consultada e aprovar tal inclusão.

10.2 Avaliação 2 - AVALIAÇÃO ATRAVÉS DOS LABORATORISTAS RESPONSÁVEIS PELA LEITURA DA CONTAGEM ESPECÍFICA DE LEUCÓCITOS NAS PROVAS DE HEMOGRAMA

1.Realizada pesquisa de *Trypanosoma sp.* na lâmina para contagem específica de leucócitos:

- 1.** Sim **2.** Não

2. Caso sim, resultado do exame:

- 1.** Negativo
- 2.** *T. cruzi* (Tc)
- 3.** *T. rangeli* (Tr)
- 4.** Infecção mista (Tc+Tr)
- 5.** Dúvida na identificação da espécie do gênero *Trypanosoma*

3. Parasitemia em cruzes*:

- 1.** < $\frac{1}{2}$ + (menor que meia cruz);
- 2.** $\frac{1}{2}$ + (meia cruz);
- 3.** + (uma cruz);
- 4.** ++ (duas cruzes);
- 5.** +++ (três cruzes);
- 6.** +++++ (quatro cruzes).

4. No caso de infecção mista (Tc+Tr) a parasitemia em cruzes:

a) *T. cruzi*

- 1.** < $\frac{1}{2}$ + (menor que meia cruz);
- 2.** $\frac{1}{2}$ + (meia cruz);
- 3.** + (uma cruz);
- 4.** ++ (duas cruzes);
- 5.** +++ (três cruzes);
- 6.** +++++ (quatro cruzes).

b) *T. rangeli*

- 1.** < $\frac{1}{2}$ + (menor que meia cruz);
- 2.** $\frac{1}{2}$ + (meia cruz);
- 3.** + (uma cruz);
- 4.** ++ (duas cruzes);
- 5.** +++ (três cruzes);
- 6.** +++++ (quatro cruzes).

*Estimativa da densidade parasitária (vide página 132).

10.3 Avaliação 3 - AVALIAÇÃO ATRAVÉS DOS LABORATORISTAS QUE EFETUARAM OUTRAS PROVAS PARASITOLÓGICAS DIRETAS DE CONCENTRAÇÃO: Método de Strout, Microhematócrito ou QBC®

1. Realizada pesquisa de *Trypanosoma sp.* anteriormente na gota espessa:

1. Sim

2. Não

2. Caso sim, qual o resultado da gota espessa:

1. Negativo

2. *T. cruzi* (Tc)

3. *T. rangeli* (Tr)

4. Infecção mista (Tc+Tr)

5. Dúvida na identificação da espécie do gênero *Trypanosoma*

3. Qual o resultado das provas parasitológicas diretas de concentração:

1. Negativo

2. Positivo para *Trypanosoma sp.*

Para confirmar a identificação deverá ser efetuada uma distensão (esfregaço) do material para identificação da espécie.

11. CÁLCULO DE FATOR DE CORREÇÃO DE UM MICROSCÓPIO (Brener, 1961)

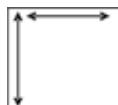
MATERIAL:

- Microscópio – objetiva de 40x
- Lamínula - tamanho 22x22
- Pipeta de Salhi ou pipeta automática – dividida em 5 μ l
- Lâmina – tamanho comum

CÁLCULO:

Colocar 5 μ l de sangue, com pipeta de Salhi (ou micropipeta automática) na lâmina e sobre esta lamínula 22x22. Distribuir esse sangue por toda a lamínula. Contar quantos campos existem de um lado ao outro da lamínula, no sentido horizontal e vertical, pelo menos 3 vezes. Feito isto, calcular a média.

Ex.:



contagem horizontal = 49 campos microscópicos

contagem vertical = 49 campos microscópicos

Após achar a média, no caso 49, calcular o total de campos presentes por toda a lamínula. Ex:

$$49 \times 49 = 2401 \text{ (total de campos)}$$

Como a contagem é feita em 50 campos, dividir o número total de campos da lamínula por 50, com a finalidade de achar o fator de correção da lamínula. Logo, $2401 / 50 = 48,02$.

No exemplo acima o fator de correção é 48.

CONTAGEM DO NÚMERO DE PARASITOS:

Após verificar o número de formas tripomastigotas em 50 campos microscópicos, multiplicar este valor pelo **fator de correção**. Exemplo: 1 forma tripomastigota em 50 campos = $1 \times 48 = 48$ formas



1 forma tripomastigota em
50 campos = $1 \times 48 = 48$ formas

1 traço = 10 campos / 5 traços = 50 campos

12. CÁLCULO DA FORÇA CENTRÍFUGA RELATIVA (FCR/G) A PARTIR DO NÚMERO DE ROTAÇÕES POR MINUTO (RPM) ou CÁLCULO DO NÚMERO DE ROTAÇÕES POR MINUTO (RPM) A PARTIR DA FORÇA CENTRÍFUGA RELATIVA (FCR/G)

12.1 CÁLCULO DO RAIO MÁXIMO

Em primeiro lugar temos que conhecer com exatidão o raio de rotação da centrífuga, que depende do tipo de rotor utilizado. Nem todos os fabricantes de centrífuga informam esta medida no manual do aparelho. Neste caso, devemos efetuar os procedimentos descritos a seguir:

Como a figura ilustra, o raio deve ser medido desde o centro do rotor até o final dos tubos, quando em rotação. A seta indica o raio máximo (R_{\max}), que corresponde à medida do centro do eixo até a parte mais externa dos tubos (Figura 19).

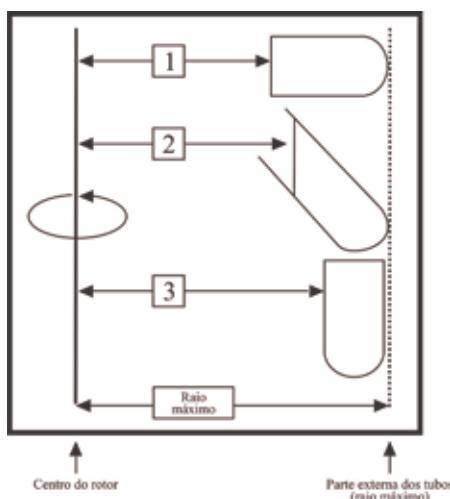


Figura 19: A figura ao lado exemplifica diferentes tipos de rotores: móvel ou horizontal (caso 1), em ângulo fixo (caso 2) e vertical (caso 3).

Fonte: *Princípios Básicos da Centrifugação*
(Modificada do site: www.coleparmer.com/techinfo/techinfo.asp?htmlfile=basiccentrifugation_PO.htm&ID=911)

12.2 CÁLCULO DE g OU rpm A PARTIR DE DUAS VARIÁVEIS CONHECIDAS:

A seguir demonstraremos duas possibilidades de fazer as conversões através do uso de uma escala denominada nomograma de força centrífuga ou através da utilização de uma fórmula matemática.

12.3 UTILIZANDO O NOMOGRAFIA (*) DE FORÇA CENTRÍFUGA:

Após a mensuração do raio de rotação da centrífuga, podemos utilizar o nomograma de força centrífuga impresso abaixo, onde as escalas A, C e B representam respectivamente raio, g (força centrífuga relativa - gravidades) e rpm (velocidade - revoluções por minuto).

No exemplo do nomograma: para encontrar a força centrífuga relativa (g) a uma distância radial de 10 cm do centro de rotação (10 cm de raio), ao se operar a centrífuga a uma velocidade de 3000 rpm, temos que colocar uma régua na tabela, conectando o ponto de 10 cm na escala de rotação do raio com o ponto de 3000 rpm na escala de velocidade. Veja o ponto de intersecção na escala de força centrífuga relativa. No nosso caso, será igual a 1000 g (Figura 20).

(*) *A nomografia é um processo de cálculo usado pela engenharia para a resolução de problemas matemáticos utilizando gráficos chamados de nomogramas. Estes são traçados a partir de um conjunto de eixos convenientemente dispostos, em forma ordenada, permitindo resolver grupos de problemas semelhantes.*

12.4 UTILIZANDO A FÓRMULA MATEMÁTICA:

FCR (força centrífuga relativa ou g) = $0,00001118 \times r \times N^2$, onde:

FCR (força centrífuga relativa) = g

r = raio de rotação (cm)

N = velocidade de rotação (rpm)

Fonte: Campbell, J M; Campbell J B. Matemática de Laboratório: aplicações médicas e biológicas. São Paulo: Ed. Roca, 1986, 348 p.

Exemplo 1: tendo o valor de rpm e querendo calcular o valor de g

No caso do exemplo acima, em que utilizamos o nomograma, onde temos o raio igual a 10 cm e o número de rotações por minuto igual a 3.000, podemos calcular o valor de g pela fórmula. Então:

$$g \text{ (FCR)} = 0,00001118 \times 10 \times N^2$$

$$g = 0,0001118 \times (3.000)^2$$

$$g = 0,0001118 \times 9.000.000$$

$g = 1.006,2$, ou seja, $g = \sim 1.000$, que foi o valor encontrado no nomógrafo, no caso do exemplo anterior.

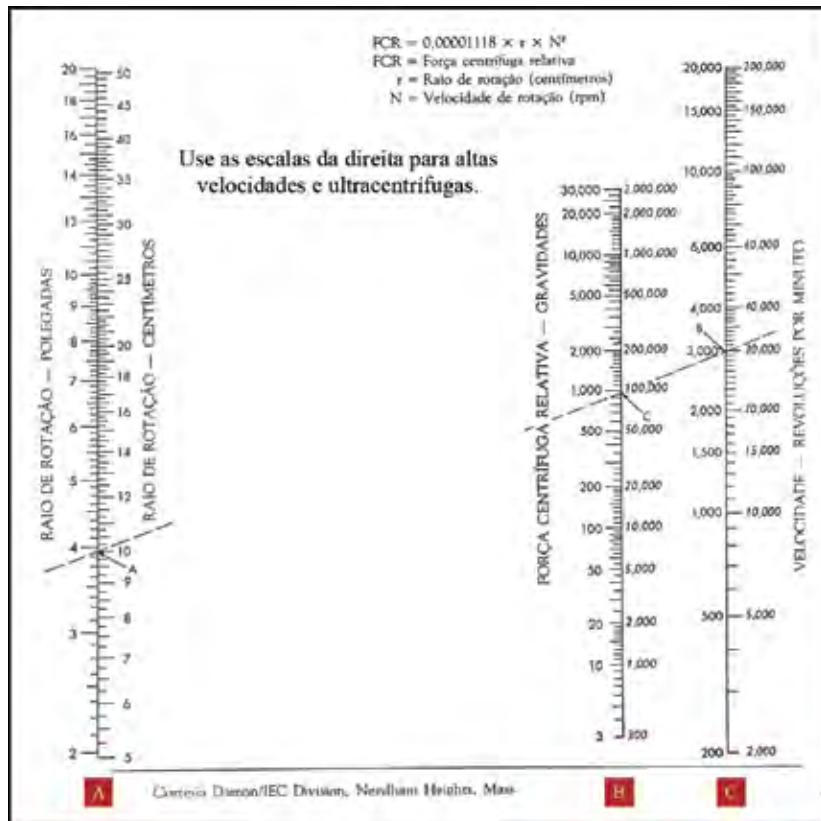


Figura 20: Nomograma.

Fonte: Campbell, J M; Campbell J B. *Matemática de Laboratório: aplicações médicas e biológicas*, São Paulo: Ed. Roca, 1986, 348 p.

Exemplo 2: tendo o valor de g e querendo calcular o valor de rpm

O *Manual Prático de Subsídio à Notificação Obrigatória no SINAN*, que explica a técnica de micro hematócrito, recomenda centrifugar 75 μ l de sangue incoagulável em tubo capilar, entre 5 e 10 minutos a 160 g em microcentrifuga. Podemos aplicar a fórmula para achar o valor correspondente a rotações por minuto (rpm), partindo do princípio de que a centrífuga só apresente escala para rpm. Supondo que o raio da minha centrífuga seja de 15 cm, teríamos:

$$160 = 0,00001118 \times 15 \times N^2$$

$$160 = 0,0001677 \times N^2$$

$$160 / 0,0001677 = N^2$$

$$954.084,67 = N^2 \quad N^2 = 954.084,67$$

$$N = \sqrt{954.084,67}, \text{ então, } N = 976,77 \text{ rpm} (\sim 980 \text{ rpm}).$$

13. PROCEDIMENTO DE PUNÇÃO DIGITAL PARA COLETA DE SANGUE VISANDO O PREPARO DE GOTAS ESPESSAS OU ESFREGAÇO

- 1) Calçar luvas de látex descartáveis e limpar vigorosamente a pele do local de punção (parte lateral do segundo ou terceiro dedo da mão, lóbulo da orelha ou, em lactentes, o dedo grande do pé ou calcanhar) com gaze ou algodão embebido em álcool a 70%; posteriormente, enxugar com gaze ou algodão secos;
- 2) Comprimir o dedo suavemente (como em ordenha) para obter outra gota de sangue esférica sobre a pele seca. Cuidar para não tocar o ponto de saída do sangue;
- 3) Segurar a lâmina firmemente pelas bordas da extremidade onde se encontra a etiqueta de identificação;
- 4) Aproximar a lâmina ao dedo do paciente (pela face onde consta a identificação) até tocar o alto da gota de sangue (evitando o contato com a pele). Se a quantidade de sangue for insuficiente, pode-se colocar outra gota ao lado da primeira;
- 5) Colocar a lâmina, com a face para cima, na superfície de trabalho;
- 6) Com o canto e os primeiros 5 mm da borda maior da segunda lâmina, espalhar o sangue formando um retângulo de tamanho e espessura adequado (aproximadamente 1,2 cm²);
- 7) Limpar o local punctionado com gaze ou algodão embebido em álcool a 70% e, se necessário, pressioná-lo;
- 8) Secar a lâmina (em temperatura ambiente, ar morno, caixa com lâmpada ou estufa), cuidando para que o sangue não se fixe por calor excessivo;
- 9) Para iniciar a pré-coloração, esperar até que o sangue esteja totalmente seco. Caso contrário pode haver perda total de material.

Fonte: Adaptado de MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE 2005. Manual de diagnóstico laboratorial da malária (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 116p.



Figura 21: Procedimento para coleta de sangue.

Fonte: RÉPUBLIQUE DÉMOCRATIQUE DU CONGO/MINISTÈRE DE LA SANTÉ/PROGRAMME NATIONAL DE LUTTE CONTRE LE PALUDISME (apud MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DEVIGILÂNCIA EM SAÚDE. *Manual de diagnóstico laboratorial da malária (Série A. Normas e Manuais Técnicos)*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 116 p.

14. MONTAGEM PERMANENTE DE LÂMINAS CORADAS UTILIZANDO ENTELLAN® *

- 1) Após a finalização do procedimento de coloração, pegar com um bastão de vidro aproximadamente uma gota de Entellan® (ou mais, dependendo da quantidade de material sobre a lâmina) e depositar sobre o esfregaço. Tomar o cuidado de colocar o entellan de uma só vez, formando uma gota única, homogênea e sem bolhas;
- 2) Pegar uma lamínula limpa em álcool-éter 1:1 e colocá-la sobre a gota de Entellan®. Essa etapa também deve ser realizada com cuidado, procurando depositar a lamínula de forma mais paralela possível em relação à lâmina e de uma vez só, evitando ao máximo a formação de bolhas;
- 3) Em seguida, a lâmina deverá ser colocada na horizontal em bancada ou suporte sem inclinação, para que o Entellan® se espalhe lentamente por capilaridade ao longo de toda a lamínula. Deve-se aguardar a lâmina estar completamente seca para ser analisada em microscópio ótico (aumento de 1000 vezes). Isso demora mais de 24 horas;
- 4) Se a amostra corada ocupar grande parte do comprimento da lâmina empregar uma lamínula retangular (tipo a usada na técnica de fluorescência indireta). É importante que todo o espaço ocupado pela amostra biológica sobre a lâmina fique “coberto” com uma lamínula;
- 5) Se o Entellan® endurecer, colocar um pouco de xilol dentro do frasco e a seguir deixar aquecer por algumas horas;
- 6) Verificar o tipo de corante usado na coloração, pois no caso do Entellan® ele tende a descolorar a lâmina, caso tenha sido utilizado eosina azul de metileno.

*Caso não disponha de Entellan®, empregar bálsamo do Canadá sintético.

15. PRINCIPAIS PROCEDIMENTOS DE BIOSSEGURANÇA EM LABORATÓRIOS DE PARASITOLOGIA

Devemos sempre ter em mente que o laboratório é um ambiente hostil, onde convivem no mesmo espaço equipamentos, microorganismos, pessoas, reagentes inflamáveis, soluções, papéis, etc.

As boas práticas de biossegurança em qualquer laboratório são condutas que visam evitar os casos de Infecções Adquiridas no Laboratório (IAL). As pessoas mais expostas a riscos de IAL são as que trabalham nos laboratórios clínicos e de pesquisa, por causa do manuseio em larga escala de materiais potencialmente infectantes.

Abaixo estão relacionadas algumas das principais normas para evitarmos acidentes laboratoriais e consequentemente nos contaminarmos:

15.1 REGRAS GERAIS

- Antes de entrar no laboratório prenda o cabelo, coloque uma calça comprida de tecido resistente; calce sapatos fechados anti-derrapantes (de preferência sapatos de couro) e vista uma camisa de algodão grosso (figura 23);
- Antes de começar as atividades laboratoriais, coloque os **Equipamentos de Proteção Individual (EPI)** adequados. Eles serão relacionados mais a frente;
- Lave as mãos antes e imediatamente após o manuseio de materiais químico e biológico independente do contato direto;
- Nunca pipete com a boca. Só use pipetadores automáticos ou manuais (exemplo: peras de borracha);
- Na tentativa de identificar um produto químico, nunca inale o conteúdo de frascos que tenham perdido o rótulo;
- Nunca prepare, beba ou coma alimentos dentro do laboratório;

- Nunca fume no laboratório;
- Nunca guarde alimentos em geladeiras e congeladores utilizados para armazenamento de material biológico e/ou químico e vice-versa;
- Se você apresentar alguma ferida na mão, no pulso ou em qualquer outra parte do corpo que venha a ficar exposta durante o trabalho no laboratório não trabalhe com material patogênico ou químico;
- Evite transportar materiais químicos e/ou biológicos com agentes patogênicos vivos de um lugar para outro no laboratório. Isso aumenta o risco de acidentes. Use caixas apropriadas para esse fim (figura 22).



Figura 22: Tipo de caixa selecionada durante o curso de transporte de material biológico, desenvolvido pela CIBio/IOC.

Fonte: Informe do IOC; Publicação do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz - Ano XII - no 44 - 30/11/2006.

OBS: O transporte de amostras biológicas gera basicamente dois tipos de preocupações: a) temperatura de transporte e o tempo; b) condições de biossegurança de quem realiza o transporte e daqueles que possam vir a ter contato eventual com o material transportado.

15.2 PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPIs)

Dispositivos ou equipamentos utilizados para proteção individual do profissional e na prevenção de acidente nas atividades de trabalhos executados em setores e unidades que oferecem riscos de acidentes.

15.2.1 GORRO - O gorro é a medida de proteção que evita a contaminação dos cabelos por aerossóis, micropartículas constituídas por microorganismos, matéria orgânica e por fragmentos expelidos pela boca.

Abaixo temos algumas observações para o correto uso dos gorros:

- Prender o cabelo;
- Cobrir todo o cabelo com o gorro;
- Deixar as orelhas protegidas pelo gorro;
- Evitar brincos;
- Ao retirar o gorro, puxe-o pela parte superior central e descarte-o no recipiente de resíduos.

15.2.2 VISEIRA FACIAL ou ÓCULOS DE PROTEÇÃO - Devem ter a melhor transparência possível não distorcendo as imagens. Protegem os olhos e o rosto contra espirros decorrentes de procedimento que envolva material molhado, radiação de fontes eletromagnéticas (laser, microondas, ultravioleta, raios x e radiação térmica), fadiga visual associado à luz muito forte, fraca ou reflexo.

Abaixo temos algumas observações para o correto uso de viseiras ou óculos de proteção:

- O visor facial deve ser lavado, após o trabalho, com água e sabão se houver sangue ou secreção visível, após cada procedimento, enxaguando abundantemente com água corrente;

- Além da lavagem com água e sabão, deve-se fazer uma desinfecção com produto químico adequado ao material que constitui o visor ou dos óculos. Aos mais friáveis, que sofrem avaria com glutaraldeído ou álcool a 70%, utilizar água oxigenada;
- Esses procedimentos devem ser realizados protegendo as mãos com luvas.

15.2.3 LUVAS - As luvas servem como barreira de proteção, prevenindo contra a contaminação das mãos durante a manipulação de material contaminado. O uso das luvas não substitui a necessidade da lavagem das mãos porque elas podem apresentar pequenos orifícios não aparentes ou danificar-se durante o uso, podendo contaminar as mãos quando removidas.

Abaixo temos algumas observações para o correto uso das luvas:

- Usar luvas de látex sempre que houver chance de contato com sangue, fluídos do corpo, trabalho com microrganismos e animais de laboratório;
- Não usar luvas fora da área de trabalho;
- Não abrir portas usando luvas;
- Não atender telefone usando luvas;
- Nunca reutilizar as luvas, e sempre descartá-las de forma segura.

15.2.4 MÁSCARA - Oferecem proteção contra partículas, substâncias ácidas, substâncias alcalinas, aldeído e para outras substâncias tóxicas.

Podem ter diferentes constituições. Máscaras descartáveis com paredes duplas ou triplas são fundamentais para a proteção contra a inalação ou ingestão de aerossóis pelos profissionais e na transmissão de microorganismos.

15.2.5 JALECOS - São usados para formar uma barreira de proteção e reduzir o risco de transmissão de microrganismos. Previnem a contaminação das roupas, protegendo a pele da exposição a sangue e fluidos corpóreos, salpicos e derramamentos de material infectado.

Devem sempre ser de mangas longas, confeccionados em algodão ou fibra sintética (não inflamável).

Abaixo temos algumas observações para o correto uso de jalecos:

- Uso de jaleco é permitido somente nas áreas de trabalho;
- Os jalecos nunca devem ser colocados no armário onde são guardados objetos pessoais;
- Devem ser descontaminados antes de serem lavados.

OBS.: Devemos trabalhar seguindo todas as recomendações citadas anteriormente, pois um agente infeccioso pode estar presente em diversos fluidos corporais como sangue, licor, urina, sêmen, etc.



Figura 23: Paramentação completa.

Fotografia de Carlos José de C. Moreira.

16. CONCEITOS E NORMAS REFERENTES À DESINFECÇÃO, ESTERILIZAÇÃO E LIMPEZA;

16.1 DESINFECÇÃO - processo físico ou químico que inativa ou destrói a maioria dos microrganismos patogênicos de objetos inanimados e superfícies, com exceção de esporos bacterianos;

16.2 ESTERILIZAÇÃO - processo físico ou químico que destrói todas as formas de vida microbiana, ou seja, bactérias nas formas vegetativas e esporuladas, fungos e vírus.

16.3 LIMPEZA - processo sistemático e contínuo para a manutenção do asseio ou, quando necessário, para a retirada de sujidade de uma superfície.

OBS: Resolução RDC-ANVISA nº 302, de 13-10-2005

Item 5.8 - Limpeza, Desinfecção e Esterilização.

5.8.1 - O laboratório clínico e o posto de coleta laboratorial devem possuir instruções de limpeza, desinfecção e esterilização, quando aplicável, das superfícies, instalações, equipamentos, artigos e materiais.

5.8.2 - Os saneantes e os produtos usados nos processos de limpeza e desinfecção devem ser utilizados segundo as especificações do fabricante e estarem regularizados junto a ANVISA/MS, de acordo com a legislação vigente.

Em caso de dúvidas sobre algum tipo de procedimento recomendamos o site: <http://www.anvisa.gov.br>

17. PRINCIPAIS COMPOSTOS DESINFETANTES

17.1 ÁLCOOIS - são mais utilizados os álcoois etílico e isopropílico. São bactericidas, eliminando também o bacilo da tuberculose, os fungos e os vírus. Não tem efeito contra os esporos bacterianos. Sua concentração ideal está entre 60 e 90% por volume. Causam a desnaturação das proteínas quando na presença de água.

17.2 COMPOSTOS BICLORADOS - geralmente usam-se os hipocloritos de sódio ou cálcio. Tem amplo espectro de antimicrobiano e ação rápida. Alguns fatores levam à sua decomposição, interferindo em suas propriedades: temperatura, concentração, presença de luz e pH. Acredita-se que estes produtos agem por inibição de algumas reações enzimáticas dentro das células, por desnaturação de proteínas e por inativação do ácido nucléico.

17.3 FORMALDEÍDO - é usado como desinfetante ou esterilizante nas formas gasosa ou líquida. É comumente encontrado como formalina, sendo esta sua diluição aquosa a 37%. A formalina é um potente bactericida, fungicida, agindo também contra vírus, bacilos da tuberculose e esporos bacterianos. Tem uso limitado por ser um composto cancerígeno.

17.4 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (ÁGUA OXIGENADA) - é um composto bactericida, esporicida, fungicida, eliminando também os vírus. Agem produzindo radical hidroxila livre que ataca a membrana lipídica, o DNA e outros componentes essenciais à vida da célula. É usado como desinfetante em concentração de 3%, para superfícies não orgânicas. Não é usado como esterilizador, pois tem atividade inferior à do glutaraldeído.

17.5 FENÓIS - agem como veneno protoplasmático, penetrando e rompendo a parede celular por precipitação de proteínas. Em baixas concentrações, causa morte celular por inativação dos sistemas enzimáticos essenciais à manutenção da integridade da parede

celular. São usados para desinfecção do ambiente hospitalar, incluindo superfícies de laboratórios e artigos médico-cirúrgicos.

17.6 COMPOSTOS IODADOS - tem ação desinfetante, bactericida, viricida, fungicida e esporicida. O composto iodado penetra a parede celular dos microorganismos rompendo a sua estrutura e inativando a síntese das proteínas e do ácido nucléico. São exemplos de compostos iodados a polivinilpirrolidona iodada, e o iodophor (Biocid®).

17.7 GLUTARALDEÍDO - é largamente utilizado como desinfetante e quimioesterilizador. Sua solução aquosa necessita de pH alcalino para eliminar esporos bacterianos. Age alterando o DNA e o RNA, bem como a síntese protéica dos microorganismos. É mais comumente usado como desinfetante de alto nível para equipamento médico. É tóxico, e, portanto, o pessoal que o manuseia deve se proteger usando luvas e óculos.

17.8 COMPOSTOS QUATERNÁRIOS DE AMÔNIA - são agentes de limpeza, porém podem ser inativados por material orgânico, não sendo mais utilizados como desinfetantes ou anti-sépticos. Tem sua ação antimicrobiana, atribuída à inativação de enzimas produtoras de energia, desnaturando proteínas essenciais das células e rompendo a membrana celular. São recomendados para sanitizar superfícies como chão, móveis e paredes (meio hospitalar).

Fontes: Kalil, E.M.; da Costa, A.J.F. Desinfecção e esterilização. Acta Ortopédica Brasileira, v. 2, p.1-4, 1994. Disponível em:<<http://www.dms.ufsc.br/mip5131/arquivos/Desinfeccao.pdf>>
McDONNEL, G.; RUSSEL, D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. Clinical Microbiology Reviews, v.12, n.1, p.147-179, 1999.

OBS.: *I. Quando iniciar um novo procedimento imagine os possíveis casos de acidente, como evitá-los e o que fazer caso eles ocorram. Isso torna o socorro muito mais rápido e eficiente, podendo salvar vidas;*
II. Todas as informações acima deverão ser complementadas com leitura dos Manuais de Biossegurança e com um curso no referido tema;
III. O bom senso associado com o conhecimento técnico tanto das medidas de biossegurança quanto dos mecanismos de transmissão dos agentes infecciosos e parasitários são extremamente importantes, tanto para saber praticar a proteção individual como a dos que nos rodeiam.

1. ESTUDO DOS TRIATOMÍNEOS

1.1 INTRODUÇÃO

Os insetos, distribuídos em diferentes ordens, constituem o grupo representado pelo maior número de espécies. Entre essas, está a ordem Hemiptera, subdividida em três subordens: Heteroptera, Stenorrhyncha e Auchenorrhyncha. Na primeira, encontram-se os percevejos e, nas duas últimas, as cigarras e os pulgões (Grimaldi & Engel, 2005).

Os percevejos são insetos com aparelho bucal do tipo picador-sugador, e podem apresentar três tipos de hábito alimentar: fitófago, que se alimenta de seiva vegetal, predador, que se alimenta do "sangue" (hemolinfa) de outros invertebrados, e o hematófago, que se alimenta do sangue dos vertebrados.

Essa diversidade de hábito alimentar pode ser identificada pelo número de segmentos do aparelho bucal que, nos fitófagos, é de quatro segmentos, nos predadores, de três segmentos, de forma curva e, nos hematófagos, também de três segmentos, porém reto (Figura 1).

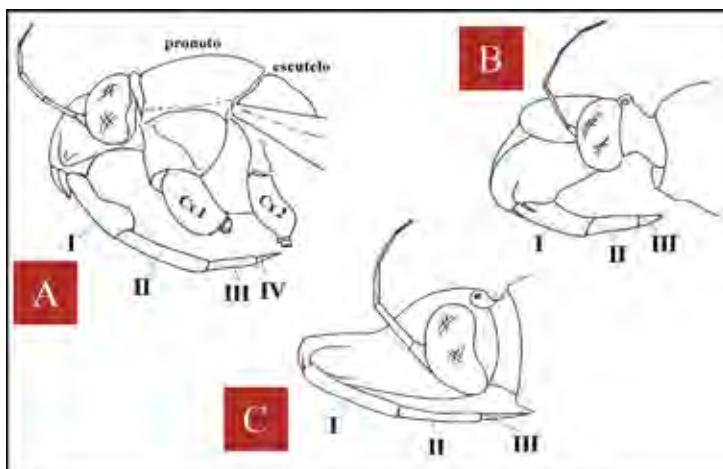


Figura 1: Morfologia do aparelho bucal: A) fitófago (aparelho bucal de quatro segmentos); B) predador (aparelho bucal de três segmentos, curvo); C) hematófago (aparelho bucal de três segmentos, reto); I – 1º segmento; II – 2º segmento; III - 3º segmento; IV – 4º segmento.

Desenho: Rubens Mello

A subordem Heteroptera é formada por 88 famílias (Grazia *et al.*, 2008; Schuh & Slater, 1995; Triplehorn & Jonnson 2011), dentre as quais a Reduviidae, que possui 22 subfamílias (Weirauch 2008), representada em sua maioria por percevejos predadores, exceto Triatominae que é hematófaga.

Esta subfamília Triatominae é subdividada em 5 tribos, onde estão incluídos os 15 gêneros e suas respectivas espécies. Para se ter uma ideia, até meados de 2010 eram conhecidas 141 espécies (Tabela 1) (Jurberg *et al.*, 2009). A maioria dessas ocorre nos países do continente americano e é encontrada no ambiente silvestre, participando ou não do ciclo de transmissão do parasito *T. cruzi*. Uma única espécie é cosmopolita e algumas outras poucas, do gênero *Triatoma* e *Linshcosteus*, são encontradas apenas no continente asiático (Schofield & Galvão 2009). Segundo Caranhas *et al.* (2011), são considerados 18 gêneros.

Os triatomíneos são conhecidos por diversos nomes nas diferentes regiões onde são encontrados. No Brasil, são conhecidos pelos seguintes nomes: Barbeiro, Chupão, Chupança, Fincão, Bicudo, Percevejão, Bicho-de-parede, Bicho-de-parede preto, Chupa-pinto, Percevejo-do-sertão, Percevejo francês, Percevejo gaudério, Percevejo grande, Procotó, Prorocotó, Baratão, Bruxa, Piolho-de-piaçava, Quiche do sertão, Rondão, Vunvun, Cascudo (Lenko & Papavero 1979), Cafeco, na língua indígena Wai-Wai (Comunicação pessoal – Teresa Cristina M. Gonçalves). Na Colômbia e Venezuela: Pito. No Equador: Chinchorro e para *Rhodnius pictipes* utilizam o nome Gúáruf e Manschú. No Peru: Chirimacha e na Bolívia tem o nome de Chinche (Lenko & Papavero 1979).

Tabela 1: Relação do número de espécies existentes nas tribos, gêneros de triatomíneos e seus habitats em ambiente natural.

TRIBOS	GÊNEROS	Nº DE ESPÉCIES	HABITATS
Alberprozeniini	<i>Alberprozenia</i>	2	arbóreo, galhos e árvores mortas
Bolboderini	<i>Bolbodera</i>	1	associados a roedores
	<i>Belminus</i>	8	arbóreo, em bromélias ou sob troncos de árvores e raramente domiciliados
	<i>Parabelminus</i>	2	arbóreo, entre copa de árvores e bromélias, provavelmente associado a gambás e roedores
	<i>Microtriatoma</i>	2	arbóreo, em bromélias, associados a gambás
Cavernicolini	<i>Cavernicola</i>	2	cavernas e buracos em troncos de árvores, associados a morcegos
Rhodniini	<i>Rhadnius</i>	17	palmeiras, muitas espécies domiciliadas
	<i>Psammolestes</i>	3	ninhos de aves
	<i>Triatoma</i>	80	associados a mamíferos, raramente a aves e répteis, muitas espécies encontradas no domicílio e peridomicílio; de considerável importância na transmissão da doença de Chagas
	<i>Panstrongylus</i>	13	associados a mamíferos, muitas espécies
			no domicílio e peridomicílio, algumas de importância na transmissão da doença de Chagas
Triatomini	<i>Dipetalogaster</i>	1	rochas; principal hospedeiro parece ser o lagarto, mas podem se alimentar em ratos
	<i>Eratyrus</i>	2	ocasionalmente no domicílio ou peridomicílio, ou associado a morcegos
	<i>Paratriatoma</i>	1	ratos silvestres
	<i>Hermalentia</i>	1	cavernas
	<i>Linshcosteus</i>	6	encontrados sob pedras e matacões

1.2 POSIÇÃO SISTEMÁTICA DOS TRIATOMÍNEOS

Reino: Animalia (Metazoa)

Filo: Arthropoda

Subfilo: Atelocerata (classificação antiga: Mandibulata)

Classe: Hexapoda (classificação antiga: Insecta)

Subclasse: Pterigota

Ordem: Hemiptera

Subordem: Heteroptera

Superfamília: Reduvioidea

Família: Reduviidae

Subfamília: Triatominae

É comum referirmo-nos a esses insetos como hemípteros, reduviídeos ou triatomíneos. Entretanto, com base nessa classificação, conclui-se que o termo mais apropriado seja “triatomíneo”, uma vez que se restringe a todos os espécimes da subfamília Triatominae.

Fonte: BUZZI, Z.J. *Entomologia didática* - 4. ed - Curitiba: Ed. UFPR. 348p., 2005.

2. ASPECTOS GERAIS

2.1 MORFOLOGIA EXTERNA

Os insetos da ordem Hemiptera, também chamados de percevejos, apresentam um cheiro característico em decorrência da presença de glândulas odoríferas (de cheiro) situadas na região do tórax. Nos triatomíneos, a responsável pelo odor característico é a glândula de Brindley.

Os triatomíneos, como todos os insetos, possuem o corpo dividido em três regiões: cabeça, tórax e abdômen (Figura 2). Na cabeça, estão localizados: o aparelho bucal, olhos compostos e ocelos além dos órgãos sensoriais que são as antenas. A estrutura onde as antenas estão inseridas denomina-se tubérculo antenífero e sua localização auxilia na diferenciação dos três principais gêneros: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*.

O tórax, formado pela união de três segmentos (protórax, mesotórax e metatórax), apresenta, em cada um deles, os apêndices locomotores, ou seja, três pares de patas e dois pares de asas. Cada um destes segmentos é acrescido de um sufixo que irá determinar a sua localização, ou seja, dorsal - noto, ventral – esterno e lateral - pleura. Assim, os segmentos dorsais são identificados como pronoto, mesonoto e metanoto; os segmentos ventrais proesterno, mesoesterno e metaesterno e os laterais propleura, mesopleura e metapleura. Esta nomenclatura é importante na medida em que é utilizada na sistemática.

O primeiro segmento torácico dorsal tem forma de trapézio e denomina-se pronoto. Esta estrutura é dividida em lobo anterior e lobo posterior e pode apresentar tubérculos, ou seja, estruturas em forma de espinhos com ponta arredondada. O segundo segmento torácico é, em sua maior parte, coberto pelo pronoto e a única região visível, denominada escutelo, tem formato triangular (Figura 2A).

O terceiro segmento é reduzido e pouco visível (Figura 2A). O primeiro par de asas está inserido no mesonoto e apresenta a metade anterior coriácea e a posterior membranosa, denominada, por isso, de hemélitro (hemi = metade; élitro = asa). Em determinadas espécies, a coloração do primeiro par de asas pode auxiliar na identificação. O segundo par é membranoso e não tem importância na sistemática.

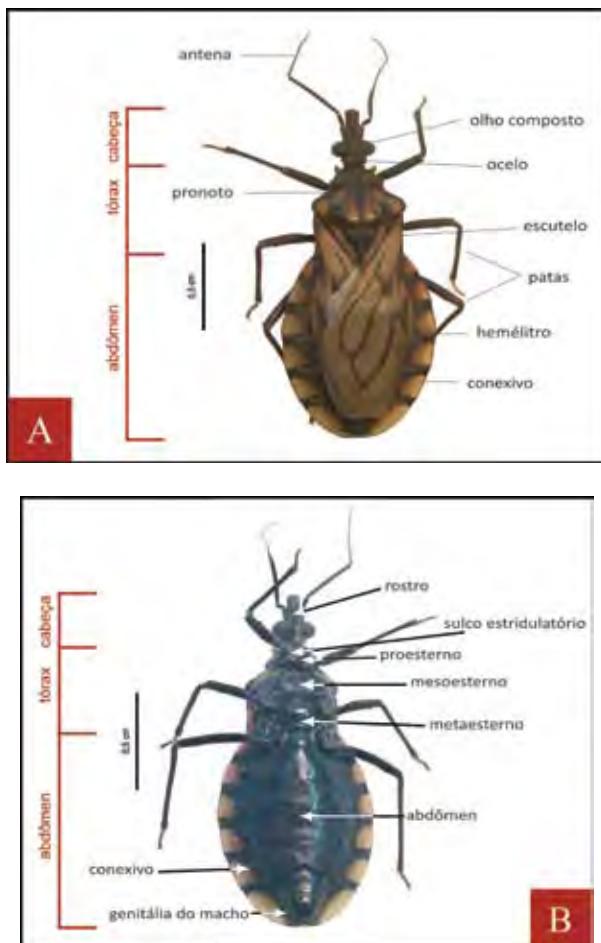


Figura 2: *Triatoma maculata*: A) vista dorsal; B) vista ventral.

Foto: Catarina Macedo

O abdômen é constituído por onze segmentos e apresenta lateralmente o conexivo, placa dorsal e ventral que permite a distensão do abdômen no ato da alimentação. Nos adultos o 8º e 9º segmentos são modificados para formar a genitália externa (Figura 2B) e nas formas jovens somente a ninfa de 5º estádio apresenta placas genitais que permitem distinguir o futuro sexo (Figura 3). No caso de fêmeas, o 8º segmento apresenta, na margem posterior, uma depressão (Figura 3A), enquanto que, nos machos, esta é reta (Figura 3B).

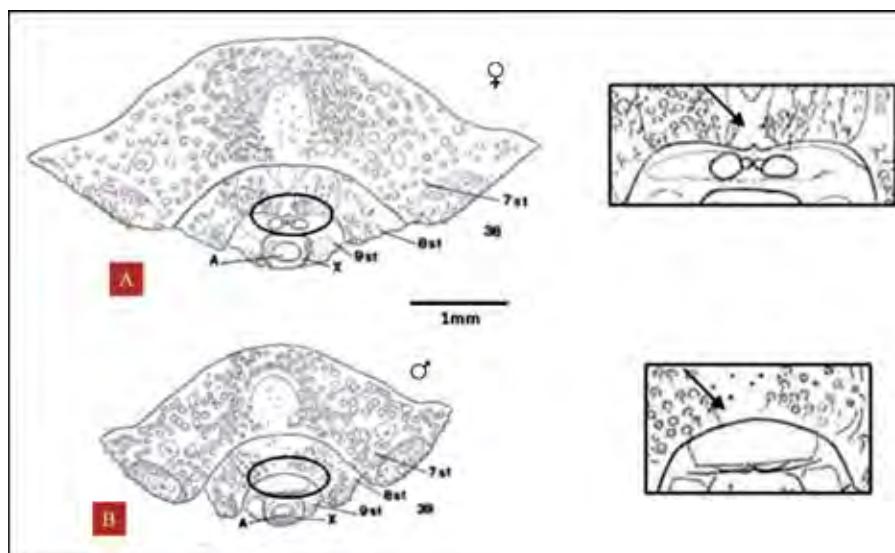


Figura 3: Diferenciação do sexo das ninhas de 5º estádio de *Triatoma maculata* de acordo com o bordo posterior do 8º segmento abdominal ventral:
 A) fêmea, com depressão mediana; B) macho, reto (Gonçalves et al. 1985).
 7st, 8 st e 9 st – esternitos dos 7º, 8º e 9º segmentos, X) tubo anal; A) ânus.

Desenho: Teresa.Cristina M. Gonçalves.

Entre os adultos, nas fêmeas apenas os segmentos ventrais são modificados para formar a genitália (Figura 4A), enquanto que nos machos, ambos os segmentos, dorsal e ventral, modificam-se (Figura 4B). O 8º em uma estrutura convexa que envolve o 9º segmento, denominado pigóforo (Figura 4B). Esse apresenta uma abertura posterior onde está inserido um par de parâmeros e, na margem inferior, uma estrutura de importância taxonômica, o processo mediano do

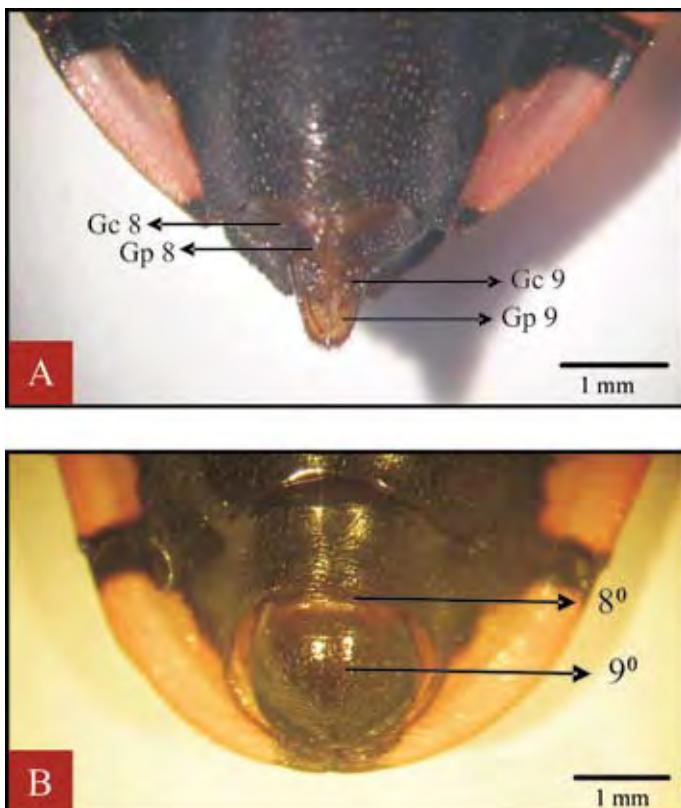


Figura 4: Últimos segmentos abdominais ventrais de *Triatoma maculata*. A) fêmea: placas genitais, gonocoxitos do 8º e 9º segmentos (Gc 8 e Gc9), gonapófises do 8º e 9º segmentos (Gp 8 e Gp9) ; B) macho: segmentos abdominais ventrais modificados em estruturas da genitália, 8º segmento e 9º segmento ou pigóforo.

Fotos: Teresa Cristina M Gonçalves.

pigóforo. No seu interior, encontra-se o falo, órgão copulador, que é constituído do edeago e do aparelho articular (Figura 5). O falo possui, em seu interior, várias estruturas quitinizadas unidas por membrana, que podem ter aspectos diferentes entre as espécies, auxiliando na diferenciação destas. Entre elas cita-se o falosoma, o suporte do falosoma (Figura 6 A e B), e o processo mediano de pigóforo (Figura 7).

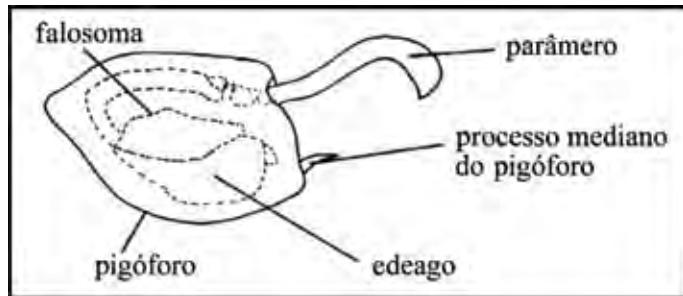


Figura 5: Estruturas da genitália externa de machos.

Adaptado por Teresa Cristina M. Gonçalves

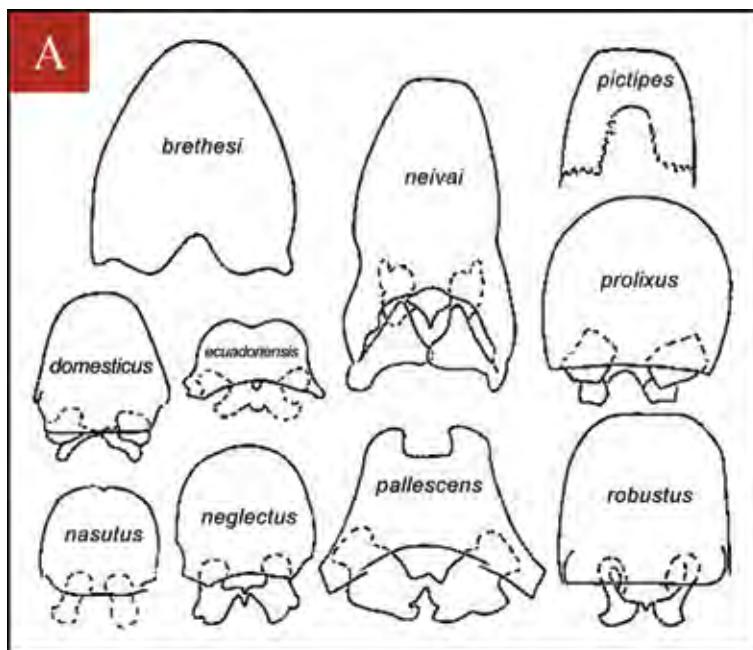


Figura 6A: Estruturas da genitália externa de machos: diferenças entre os falosomas de dez espécies do gênero *Rhodnius*.

Desenho: Lent & Jurberg 1969.

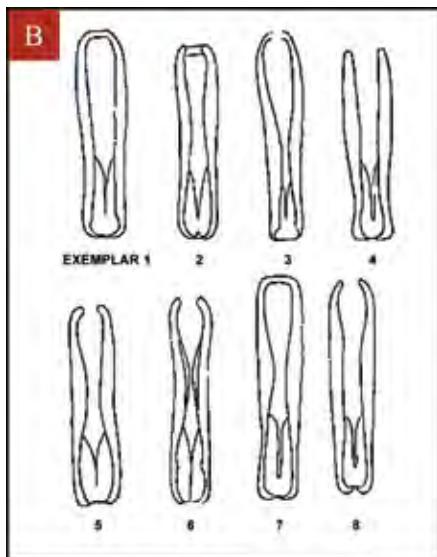


Figura 6B: Estruturas da genitália externa de machos: variação intraespecífica do suporte do falosoma de oito exemplares de *Triatoma dimidiata*.

Desenho: Lent & Jurberg 1985.

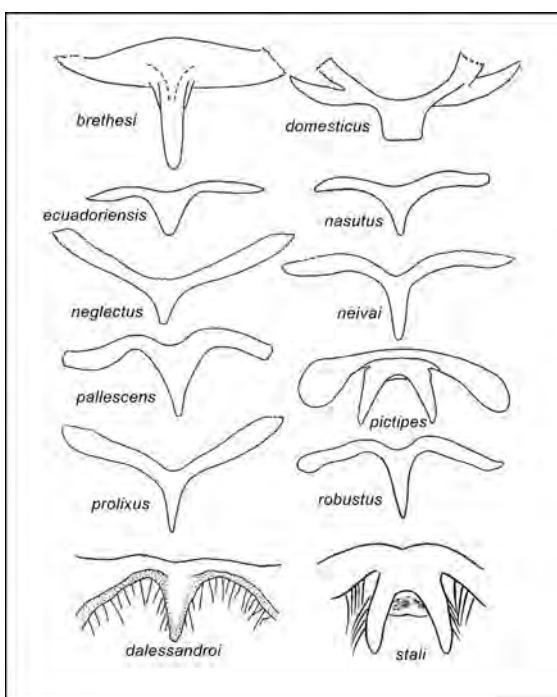


Figura 7: Processo mediano do pigóforo de espécies do gênero *Rhodnius*.

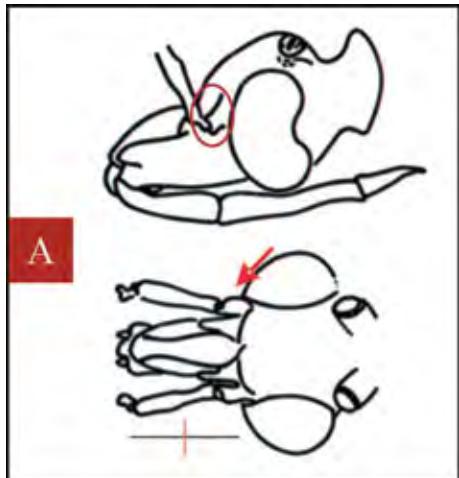
Desenho: Lent & Jurberg 1985.

2.2 CONHECENDO E DIFERENCIANDO OS GÊNEROS DE TRIATOMÍNEOS

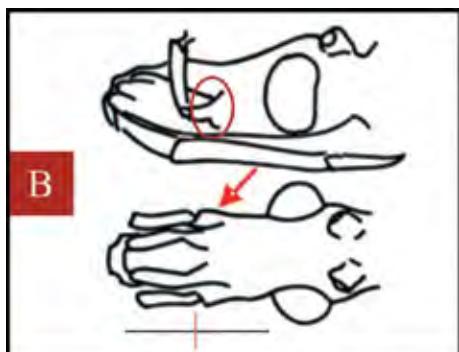
Para a identificação dos gêneros e das espécies, utiliza-se a chave dicotômica que vem publicada em várias obras especializadas. Essa chave baseia-se na descrição de uma série de características relacionadas com a forma, o tamanho e a coloração de várias estruturas do corpo do inseto, possibilitando identificar a espécie em questão.

A diferenciação dos três principais gêneros de interesse médico pode ser feita através da localização do tubérculo antenífero, isto é, do ponto de inserção das antenas na região anteocular (Figura 8).

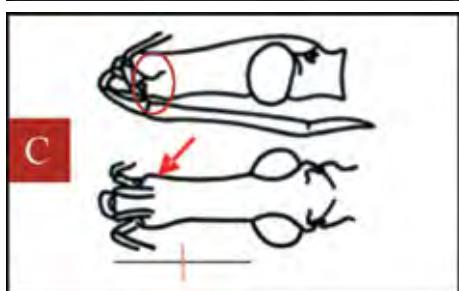
- Gênero ***Panstrongylus*** – apresenta a cabeça curta, de aspecto “robusto”, com a inserção das antenas antes da metade da região anteocular, ou seja, na região imediatamente anterior aos olhos compostos (Figura 8A);
- Gênero ***Triatoma*** – apresenta a cabeça de tamanho médio, com a inserção das antenas na metade da região anteocular, ou seja, na metade da distância entre os olhos compostos e o clípeo (Figura 8B);
- Gênero ***Rhodnius*** – apresenta a cabeça alongada, com a inserção das antenas após a metade da região anteocular, ou seja, próxima ao ápice da cabeça (Figura 8C).



A



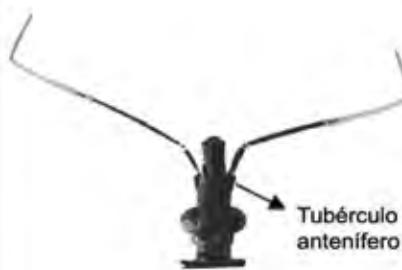
B



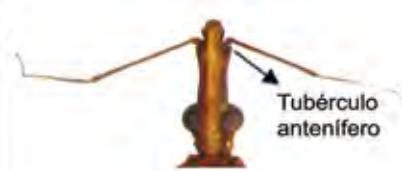
C



Gênero *Panstrongylus*



Gênero *Triatoma*



Gênero *Rhodnius*

Figura 8: Diferenciação dos principais gêneros pelo ponto de inserção do tubérculo antenifero: A) *Panstrongylus* - tubérculo antenifero situado antes da metade da região anteocular; B) *Triatoma* - tubérculo antenifero situado na metade da região anteocular; C) *Rhodnius* - tubérculo antenifero situado após a metade da região anteocular. Indicação do ponto de inserção do tubérculo (↗); mensuração da região anteocular (—+—).

Adaptado por Teresa Cristina M. Gonçalves e Angela C. V. Junqueira.

A coloração, também denominada de padrão cromático do inseto, é uma característica muito importante na identificação das espécies de triatomíneos. Entretanto, algumas espécies apresentam variação cromática intraespecífica, isto é, uma mesma espécie pode apresentar coloração diferente. Essa confirmação é feita através de estudos muito específicos, denominados de análises bioquímicas e moleculares. Como exemplo, cita-se *Triatoma infestans*, espécie que apresenta três padrões cromáticos denominados mataral, clair e darkmorph (Figura 9).



Triatoma infestans - Darkmorph

Foto: François Noireau.



Triatoma infestans

Silvestre - Mataral

Foto: Mirko Rojas.



Triatoma infestans

Clair

Foto: François Noireau.

Figura 9: Diferentes padrões cromáticos de *Triatoma infestans*.

Fonte: NOIREAU, F., CORTEZ, M.R. & GÜRTLER, R. Los Focos Silvestres de *Triatoma infestans* en Bolivia. In: Triatomíneos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud y Desportes, Programa Nacional de Chagas, Bolivia, 2007. p. 205-213.

3. ASPECTOS DA BIOLOGIA

3.1 CICLO DE VIDA

Os triatomíneos apresentam três fases de desenvolvimento: ovo, ninfa e adulto. As ninfas, também chamadas de formas jovens, são diferentes dos adultos porque não têm asas nem genitália formada. Entretanto, 5º estádio apresentam placas genitais que permitem diferenciar macho de fêmea, conforme mencionado anteriormente (Figura 4).

A fêmea inicia a postura aproximadamente entre 20 a 30 dias após a cópula. A coloração dos ovos inicialmente é branca leitosa e, à medida que o embrião se desenvolve, torna-se rosada até atingir a coloração avermelhada, indicando que o embrião está formado e próximo à eclosão do ovo (Figura 10A). Entretanto, em *R. brethesi* os ovos apresentam coloração acinzentada clara, que vai escurecendo conforme o desenvolvimento do embrião.

Essa coloração avermelhada deve-se à presença da nitroforina, uma substância presente na hemoglobina, encontrada no sangue que a fêmea ingeriu. Esses podem ser colocados soltos ou presos ao substrato (Figuras 10B e 10C), neste caso fator importante para a dispersão das espécies.

O período de incubação é de aproximadamente duas semanas. A eclosão ocorre quando o opérculo se solta do ovo permitindo que a ninfa saia. Inicialmente esta tem coloração rosada, devido à presença da nitroforina, e no período de uma hora, o contato com o ar faz com que a coloração definitiva se estabeleça em tons de marrom ou preto, dependendo da espécie. Este fato também é observado a cada ecdise, ou seja, na troca do tegumento do estádio anterior pelo estádio que está iniciando. Uma vez desprendido do corpo, o tegumento liberado recebe o nome de exúvia (Figura 10D).

Através do Microscópio Eletrônico de Varredura, que possibilita analisar as estruturas em aumento muito grande, foi possível verificar que a casca dos ovos pode apresentar ornamentações diferentes, contribuindo para a identificação de espécies (Figura 11).

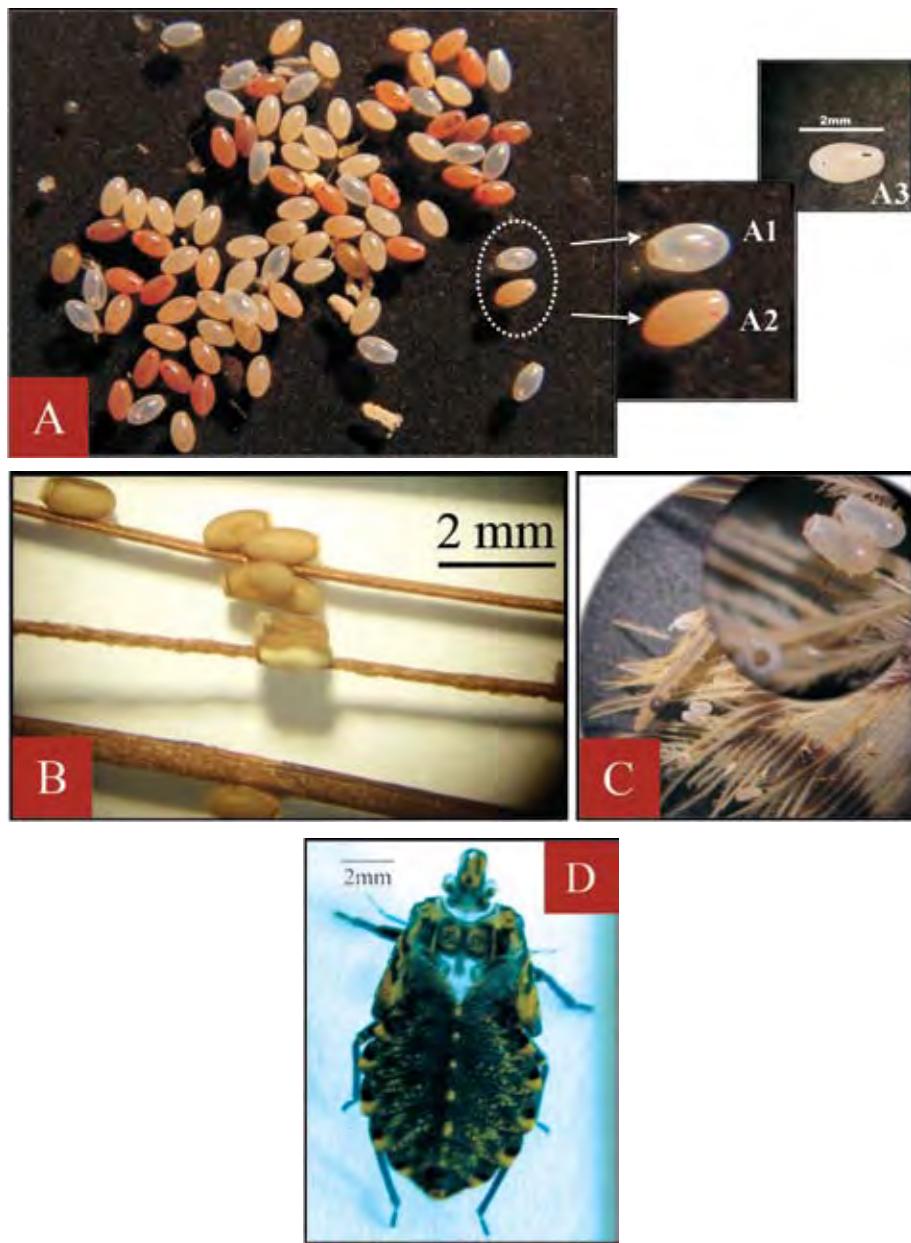


Figura 10: A) ovos de triatomíneos soltos no ambiente: em detalhe; A1) ovo ecldido, A2) ovo embrionado; A3) medida aproximada do ovo; B) ovo de *Rhodnius brethesi* colado na palha da piaçava; C) ovos colados na pena de ave; D) exúvia.

Foto e montagem: Catarina Macedo (A e C) e Teresa Cristina (B e D).

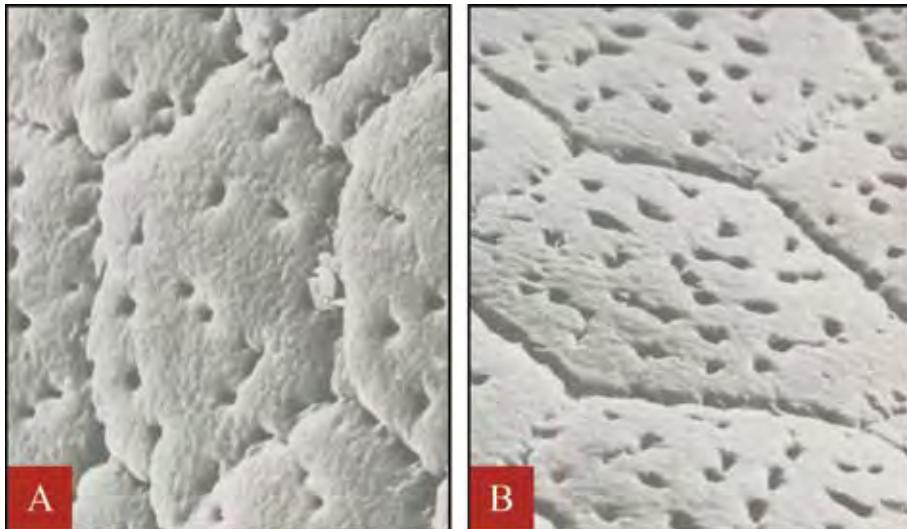


Figura 11: Detalhe das células exocoriais do ovo em microscopia eletrônica de varredura (3300x): A) *Triatomma maculata*; B) *Triatomma pseudomaculata*.

Fotos: Wanderley de Souza, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 263-276, 1985.

Cada período compreendido entre uma muda e outra é denominado de estádio. Ao todo são cinco estádios de ninfas seguidos de um adulto alado, completando um ciclo que pode variar de seis meses a dois anos, dependendo da espécie (Figura 12).

Para que os insetos mudem de um estádio para outro é necessário que ocorra, no mínimo, um repasto sanguíneo, porque é a distensão abdominal junto com outros fatores (fatores proteicos), provenientes da alimentação sanguínea (hemoglobina), que vão ativar as células neurosecretoras. Estas por sua vez irão desencadear uma série de mensagens ao cérebro, que serão responsáveis pela produção dos hormônios da muda (ecdisona) e do crescimento (hormônio juvenil). O hormônio do crescimento, mesmo na fase adulta da fêmea, é importante para a maturação dos ovos.

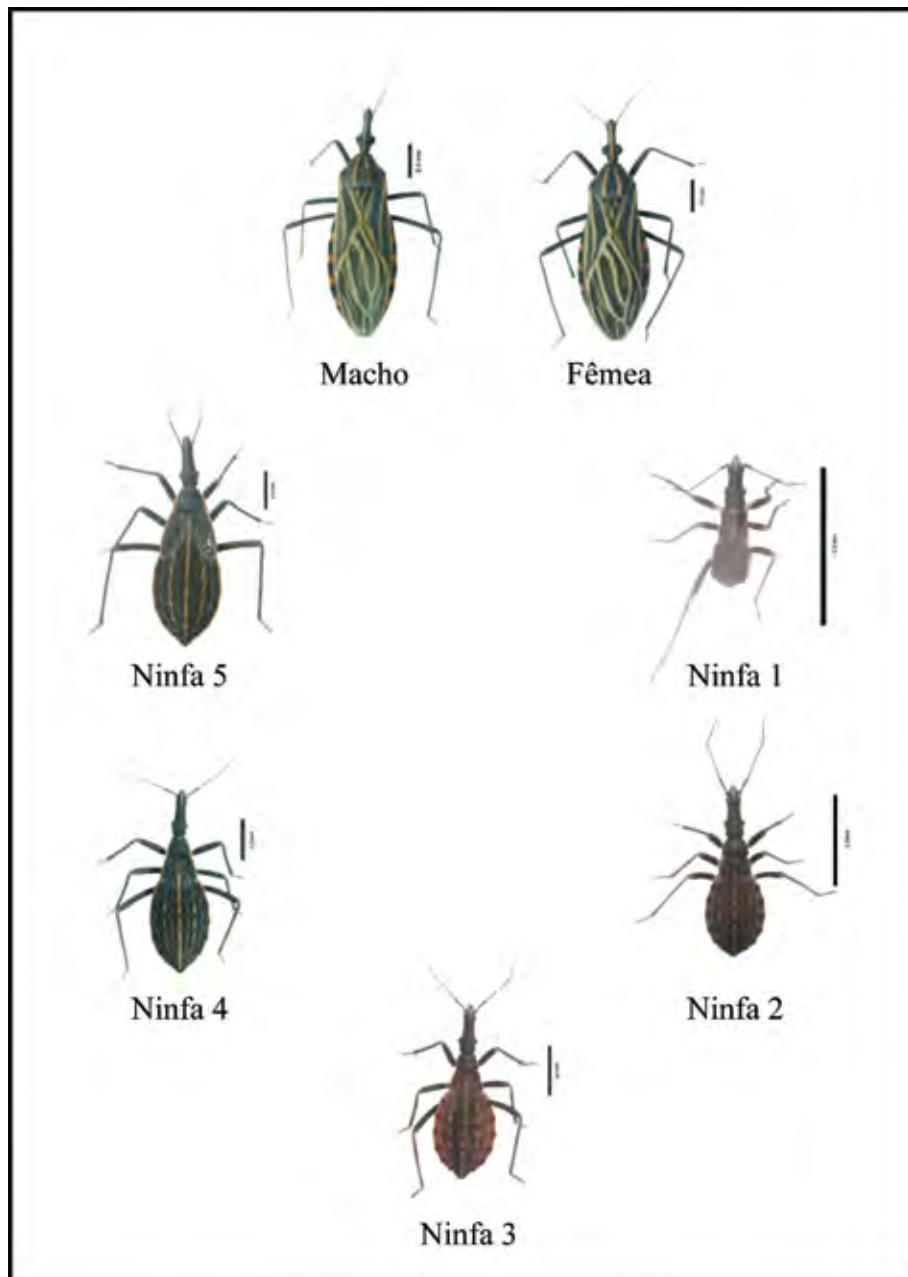


Figura 12: Ilustração do ciclo evolutivo de *Rhodnius brethesi*. Escala = 2,5 mm.

Foto e montagem: Catarina Macedo.

Entretanto, a complementação do ciclo biológico depende de fatores abióticos, como a temperatura, que deve estar entre 27 e 30 °C, e a umidade relativa entre 60 a 100%, dependendo da espécie. Quando essas condições estão muito alteradas, as ninfas podem não conseguir realizar a muda e morrer presas à exúvia, podendo também ocorrer alterações morfológicas após a ecdisse, a diminuição drástica da postura e a eclosão dos ovos. A temperatura, além de outros fatores do ambiente externo (posição geográfica, ecótopos) (Caro-Riaño *et al.* 2009; Hochkirch *et al.* 2008; Jaramillo 2002), bem como isolamento físico entre as populações domiciliadas e peridomiciliadas (Schater-Broider *et al.* 2004), podem exercer influência na morfologia. O tempo de desenvolvimento é um dado importante para as ações de controle, uma vez que as borrifas devem atuar de modo que os insetos não cheguem à fase adulta, consequentemente, diminuindo as chances de recolonização do ambiente que foi tratado.

A hematofagia é praticada em todos os estádios do ciclo evolutivo e na fase adulta, tanto a fêmea quanto o macho também são hematófagos. Do ponto de vista epidemiológico, este fato é importante porque aumenta a chance de transmissão do parasito *Trypanosoma cruzi*. As ninfas de quinto estádio são as que ingerem maior quantidade de sangue. Na fêmea o sangue é de extrema importância para a maturação dos ovários e a oviposição.

3.2 RESISTÊNCIA AO JEJUM E DEFECAÇÃO

Após a alimentação inicia-se o processo da digestão do sangue. Nesse período, ocorre a produção do corpo gorduroso, massa sem forma que cobre e envolve os órgãos internos na cavidade do corpo do inseto (hemocele), cuja coloração pode variar de branca leitosa a amarelo claro. Esse tem como função acumular reservas nutritivas, permitindo ao inseto permanecer um tempo razoável sem se alimentar. A esse período é dado o nome de resistência ao jejum.

Entre os triatomíneos esse período de resistência ao jejum é maior nas ninfas de 5º estádio, entretanto, pode variar entre as espécies. Segundo Canale et al. (1999), o maior período foi observado para a espécie *T. vitticeps* (180 dias) e o menor para *T. brasiliensis* (58 dias).

A resistência ao jejum tem sua importância para o planejamento de programas de controle ao vetor, na medida em que, os insetos que estão alimentados podem ficar por um longo período longe do contato com a superfície que foi tratada com inseticida. Desta forma, os insetos podem voltar a se alimentar e recolonizar o domicílio após o término do poder residual do inseticida.

O tempo de defecação é outro aspecto de extrema importância para caracterizar a capacidade de transmissão do parasito pelo triatomíneo, uma vez que aqueles que depositam suas fezes sobre o hospedeiro têm maior chance de transmitir o parasito do que aqueles que defecam fora da fonte alimentar (Figura 13).

Na falta do hospedeiro, esses insetos também podem realizar o coprofagismo, isto é, alimentar-se das fezes eliminadas por outros triatomíneos, e o predatismo, ou seja, alimentar-se do conteúdo intestinal (sangue do vertebrado) ou do conteúdo abdominal (sangue do inseto ou hemolinfa) (Figura 14).



Figura 13: *Rhodnius brethesi* defecando sobre o hospedeiro.

Foto: Carlos José C. Moreira.



Figura 14: Ninfa de 5º estádio de *Triatoma brasiliensis*, realizando o predatismo em ninfa de barata (*Blattidae*).

Foto: Catarina Macedo.

3.3 DISPERSÃO DOS TRIATOMÍNEOS

O tamanho das populações de insetos em seu ambiente natural depende da presença de hospedeiros (fonte alimentar), uma vez que, aumentando o número de triatomíneos, cada inseto passa a ter menores quantidades disponíveis de sangue. Essa redução alimentar afeta diretamente o desenvolvimento do inseto e faz com que os adultos, machos e fêmeas, saiam em busca de outras fontes alimentares. Desta forma, ocorre a dispersão dos triatomíneos, outro aspecto importante para as ações de controle.

Essa dispersão pode ocorrer através de dois mecanismos: um passivo, através do qual ele é transportado por algum animal, como por exemplo: colado na pena das aves (Figura 10 D) ou em objetos pelo próprio homem (vestimentas, folhas de palmeiras); e outro ativo, quando ele se desloca por meio do voo ou caminhando.

A dispersão ativa está diretamente associada com o estado nutricional das formas adultas, a elevada temperatura e a regulação da

densidade das populações (Lehane & Schofield 1981, 1982, Williams & Schofield 1985, Lehane et al. 1992). Nos adultos, com longo período de jejum, as reservas nutritivas são utilizadas no desenvolvimento dos músculos torácicos, responsáveis pelo batimento das asas, conforme sugere Gringorten & Friend (1979) para *R. prolixus*, o que corrobora a captura de insetos adultos nas armadilhas, sem conteúdo estomacal.

A destruição dos ecossistemas naturais (ambiente de mata) geralmente ocasiona a fuga da fauna local, contribuindo para o processo de dispersão de espécies de triatomíneos silvestres para dentro de casa.

A ação do homem (antrópica) no meio ambiente contribui de forma significativa para que ocorra a dispersão, uma vez que, afugentando ou levando à morte os hospedeiros, faz com que os triatomíneos saiam em busca de alimento (Barreto 1967, Forattini et al. 1971, 1979). Nesse movimento, os triatomíneos podem ser atraídos por uma fonte luminosa e invadir o peridomicílio ou o domicílio. A dispersão também pode ocorrer quando a infestação domiciliar atinge uma taxa elevada. Nesse caso, podem ocorrer a invasão e recolonização de áreas que passaram pelo processo de borrifação. No ambiente domiciliar o que leva à dispersão é o crescimento das espécies domiciliadas, fazendo com que invadam áreas tratadas.

A capacidade de voo destes insetos pode variar dependendo do seu habitat. As espécies silvestres mantêm maior capacidade de voo. De acordo com Schofield & Matthews (1985), *Triatoma infestans* apresentou uma distância média de voo em torno de 200 m, enquanto que, Schweigmann et al. (1988), verificaram voos com mais de 1 km. Entretanto, nas populações domésticas a capacidade de voo pode ser progressivamente reduzida (Schofield et al. 1999), conforme a observação que evidenciou a completa atrofia dos músculos torácicos em populações mantidas em laboratório.

3.4 INIMIGOS NATURAIS

Assim como todos os animais, os triatomíneos também têm inimigos naturais, como os artrópodes em geral que incluem insetos (louva-a-deus, percevejos, besouros, baratas, moscas e formigas), outros artrópodes (aranhas, ácaros, pseudoescorpiões, centopéias) e os parasitos de ovos, nesse caso todos da ordem Hymenoptera.

4. ASPECTOS DA ECOLOGIA

4.1 TIPOS DE AMBIENTES ONDE OS BARBEIROS PODEM SER ENCONTRADOS

4.1.1 DOMICILIAR E PERIDOMICILIAR

Os triatomíneos vivem em diferentes tipos de ambientes silvestres associados a mamíferos, aves e répteis, que servem como fonte de alimentação. As crescentes alterações nestes ambientes acarretam na invasão e colonização do domicílio, principalmente nas construções de pau-a-pique, onde se escondem entre as frestas e rachaduras (Figura 15). No peridomicílio, podem colonizar galinheiros, currais, amontoados de telhas, tijolos e pátios (Figura 16).

4.1.2 SILVESTRE

No ambiente natural, os triatomíneos ocupam ambientes variados, onde cada espécie encontra aquele local que apresenta condições favoráveis ao seu desenvolvimento. Algumas espécies de *Triatoma*



Figura 15: Tipos de construções comumente encontradas em áreas rurais dos estados brasileiros: A) residência de pau-a-pique; B) residência construída com madeira e palha.

Fotos: Catarina Macedo.



Figura 16: Tipos de ambientes no peridomicílio:
A) amontoado de tijolos; B) amontoado de telhas.

Fotos: Teresa Cristina M. Gonçalves.

podem ser encontradas exclusivamente, em ninhos de pássaros ou em buracos nas árvores próximas aos ninhos, (Figura 17), enquanto outras ocorrem em áreas onde as formações rochosas são abundantes ou no interior de cavernas associadas a morcegos (Figura 18).

As espécies que compõem o gênero *Rhodnius* têm como habitat mais comum as palmeiras (babaçu, buriti, inajá, etc.), ambiente onde são encontrados pássaros, pequenos roedores e lacertídeos que servem de fonte alimentar (Figura 19).

Não há muita informação sobre os tipos de ambientes silvestres onde são encontradas as espécies do gênero *Panstrongylus*. Os poucos registros existentes indicam que estão associados às tocas de animais no solo (buraco de tatu e ocos em árvores) (Figura 20). Entretanto, são diversos os registros de ocorrência de espécies desse gênero invadindo o ambiente domiciliar, atraídos pela luz.



Figura 17: Ninhos de aves são habitat, onde comumente há o registro da ocorrência de espécies dos gêneros *Rhodnius* e *Psammolestes*:
A) ninhos de graveteiros; B) ninho em destaque.

Fotos: Catarina Macedo.



Figura 18: Afloramentos rochosos onde é comum encontrar espécimes de triatomíneos associados aos mamíferos e pequenos roedores e lacertídeos.

Foto: Catarina Macedo.

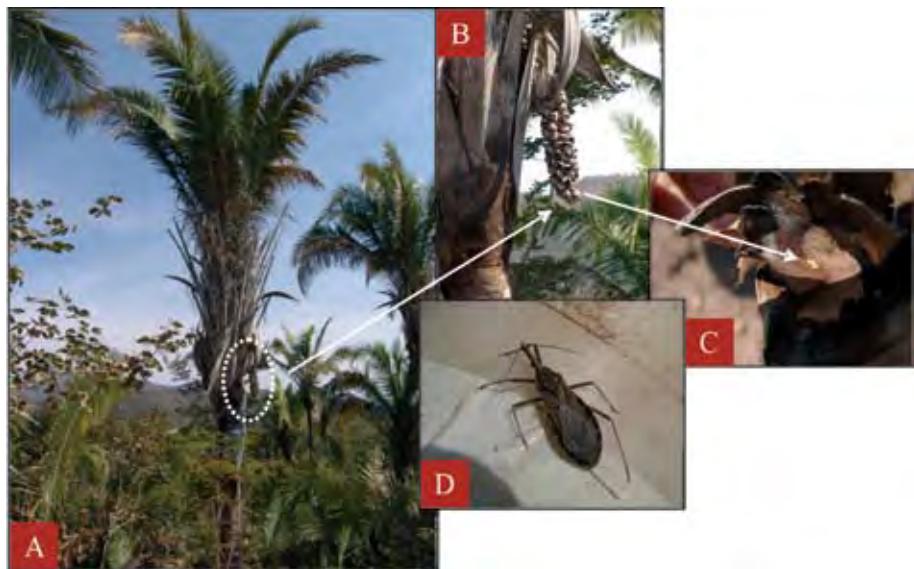


Figura 19: Tipo de habitat de espécies do gênero *Rhodnius*: A) aspecto geral de uma palmeira de babaçu; B) cacho de frutos da palmeira; C) detalhe de postura de *Rhodnius* no interior do cacho; D) espécime de *Rhodnius neglectus* encontrado na palmeira.

Fotos: Catarina Macedo.



Figura 20: Tipos de ambiente natural onde são encontradas espécies do gênero *Panstrongylus*: A) buraco no solo; B) oco de árvore.

Fotos: Catarina Macedo.

5. ALGUMAS ESPÉCIES DA AMAZÔNIA LEGAL

São oito os países que constituem a Amazônia Legal: Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Venezuela, e o território ultramarino francês, a Guiana Francesa. Encontram-se listadas abaixo algumas espécies:

Tribo Cavernicolini

- *Cavernicola lenti* – coloração marrom escuro, com duas manchas amareladas no hemélitro (Figura 23);
- *Cavernicola pilosa* – corpo abundantemente piloso, exceto a membrana do hemélitro. Cor marrom escuro à preta (Figura 23);

Tribo Rhodniini

- *Rhodnius brethesi* – colorido preto com manchas e listras marrom-claras, na superfície da cabeça e pescoço, pronoto, escutelo, hemélitro, conexivo e superfície ventral do abdômen (Figura 22);
- *Rhodnius neglectus* – colorido marrom claro, com manchas da cor marrom-escuro na cabeça, pronoto, escutelo, cório e conexivo, e áreas amareladas no abdômen ventral, no conexivo, na coxa e trocanter (Figura 22);
- *Rhodnius pictipes* – colorido marrom amarelado e com manchas de cor marrom-escuro em várias regiões do corpo e apêndices; aspecto geral sarapintado (Figura 22);
- *Rhodnius prolixus* – coloração marrom amarelado com manchas marrom-escuas em várias regiões do corpo e dos apêndices (Figura 22);
- *Rhodnius robustus* – colorido marrom amarelado, com muitas manchas de cor marrom escuro em várias regiões do corpo e nos apêndices (Figura 22);

R. prolixus, *R. robustus*, *R. nasutus* e *R. neglectus* são espécies com caracteres morfológicos muito semelhantes e formam o complexo *prolixus* (Lent & Wygodzinsky 1979, Barrett 1988). Atualmente, foram adicionadas a este complexo as espécies *Rhodnius domesticus* e *Rhodnius neivai* (Dujardin *et al.* 1999, Carcavallo *et al.* 2000, Lyman *et al.* 1999, Monteiro *et al.* 2000, Monteiro *et al.* 2003). Embora haja dificuldade na identificação de *R. nasutus* e *R. neglectus*, esta não é tão acirrada quanto a existente entre *R. prolixus* e *R. robustus*. Atualmente, a variabilidade genética encontrada em *R. robustus* deu origem ao complexo *robustus* (Monteiro *et al.* 2003, Pavan & Monteiro 2007).

Tribo Triatomini

- *Eratyrus mucronatus* – colorido geral marrom escuro ou preto. Região lateral do pescoço e no abdômen ventral amarelado. Cório com marcas vermelhas subapical (Figura 23);
- *Triatomma maculata* – coloração geral marrom-escuro à preta, com uma mancha amarelo-clara, laranja amarelada ou vermelho-clara na cabeça, pescoço e tórax (Figura 21);
- *Panstrongylus diasi* - colorido marrom amarelado, com áreas de cor marrom-escuro no pronoto e conexivo;
- *Panstrongylus geniculatus* – colorido marrom-claro ou marrom-alaranjado claro com manchas de cor marrom-escuro ou preta em várias partes do corpo. Superfície do corpo sem pelo (Figura 21);
- *Panstrongylus herreri** – colorido dorsal marrom-claro amarelado, ventralmente marrom-escuro ou preto. Manchas dorsais, variando de coloração marrom-escuro à preta, presentes na cabeça, pescoço, pronoto escutelo, hemélitro e conexivo (Figura 21);
- *Panstrongylus lignarius** – colorido dorsal marrom-claro e ventral ferruginoso, marrom-escuro ou preto (Figura 21);

(*) De acordo com Galvão *et al.* (2003), *P. herreri* passou a sinonímia de *P. lignarius*.

5.1 ILUSTRAÇÃO DAS ESPÉCIES



Panstrongylus geniculatus



Panstrongylus herreri



Panstrongylus lignarius



Panstrongylus rufotuberculatus



Triatoma maculata

Figura 21: Espécies do gênero *Panstrongylus* e *Triatoma* da Amazônia Legal.
Fotos: Catarina Macedo.



Rhodnius brethesi



Rhodnius pictipes



Rhodnius neglectus



Rhodnius prolixus



Rhodnius robustus

Figura 22: Espécies do gênero *Rhodnius* da Amazônia Legal.

Fotos: Catarina Macedo.



Cavernicola lenti



Cavernicola pilosa



Eratyrus mucronatus

Figura 23: Espécies do gênero *Cavernicola* e *Eratyrus* da Amazônia Legal.
Fotos: Catarina Macedo.

- *Panstrongylus rufotuberculatus* – colorido geral marrom-escuro ou preto com manchas de cor marrom-claro amarelado ou avermelhadas na cabeça. Hemélitro com colorido esverdeado pálido (Figura 21).

6. MORFOLOGIA INTERNA

6.1 SISTEMA DIGESTIVO

O sistema digestivo dos triatomíneos é dividido em três partes: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior. Desses, o intestino médio ainda é dividido em duas regiões: estômago e intestino (Lacombe 1957) (Figuras 24 e 25).

6.1.1 INTESTINO ANTERIOR

É precedido pelo rostro, que, em repouso, está preso à parte inferior da cabeça e mantém, no seu interior, os estiletes bucais, mandíbulas e maxilas. As primeiras são responsáveis pela perfuração do tecido e as segundas pela sucção do sangue do hospedeiro, bem como pela injeção das substâncias produzidas pelas glândulas salivares. Essa sucção é realizada pela faringe curta e musculosa, que tem continuidade com o esôfago mais alongado.

As glândulas salivares são em número de três pares e localizam-se na cavidade torácica, presas à região mediana do esôfago. Nessas glândulas, são produzidas substâncias anticoagulantes e vasodilatadoras que auxiliam na alimentação do inseto.

6.1.2 INTESTINO MÉDIO

Compreende a maior porção do tubo digestivo do triatomíneo e é formado pelo pró-mesêntero (estômago) e pós-mesêntero (intestino). O estômago, quando cheio de alimento, ocupa grande parte da cavidade do corpo do inseto, empurrando os outros órgãos para os lados.

6.1.3 INTESTINO POSTERIOR

É constituído pela ampola retal, um saco muscular com considerável

capacidade de distensão, onde desembocam os quatro túbulos de Malpighi de tamanhos variáveis. Esses são responsáveis pela retirada dos resíduos metabólicos da cavidade do corpo, também denominada de hemocele, originando a urina. Na ampola retal, ficam contidas fezes e urina para serem eliminadas, posteriormente, pelo reto.

Nos insetos infectados, os tripanosomas metacíclicos, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, são encontrados na ampola retal, de onde são expulsas junto com as fezes ou com a urina. As espécies consideradas vetores em potencial têm, por hábito, defecar no ato da alimentação e é neste momento que estas formas do parasita são depositadas sobre o hospedeiro.

6.1.4 GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares tem grande diversificação quanto ao número, tamanho, forma nos diferentes triatomíneos. Em geral, localizam-se na cavidade torácica, junto à parte inicial do tubo digestivo, onde encontram espaço suficiente para seu desenvolvimento. O deslocamento para a região abdominal resulta dos eventuais movimentos peristálticos dos órgãos vizinhos. As glândulas salivares são em número de três pares, utilizando-se a nomenclatura D1, D2 e D3, para cada um deles: o par D1 corresponde às glândulas principais, o D2 às glândulas suplementares e o par D3 às glândulas acessórias. Em todas as espécies de triatomíneos estudadas, são encontrados três pares de glândulas salivares, com exceção do gênero *Rhodnius*, que não apresenta a típica glândula D3. De forma geral, as glândulas D1 e D2 têm cor branco-leitosa ou um pouco amarelada, como ocorre em *P. megistus*. Entretanto, no gênero *Rhodnius* as glândulas D1 e D2 são alongadas e de cor avermelhada (Barth 1954; Lacombe 1999) (Figura 25).

Nestas glândulas, podem ser encontradas formas infectantes de *Trypanosoma rangeli*, que são introduzidas no hospedeiro vertebrado, durante a salivação, no início do repasto sanguíneo.

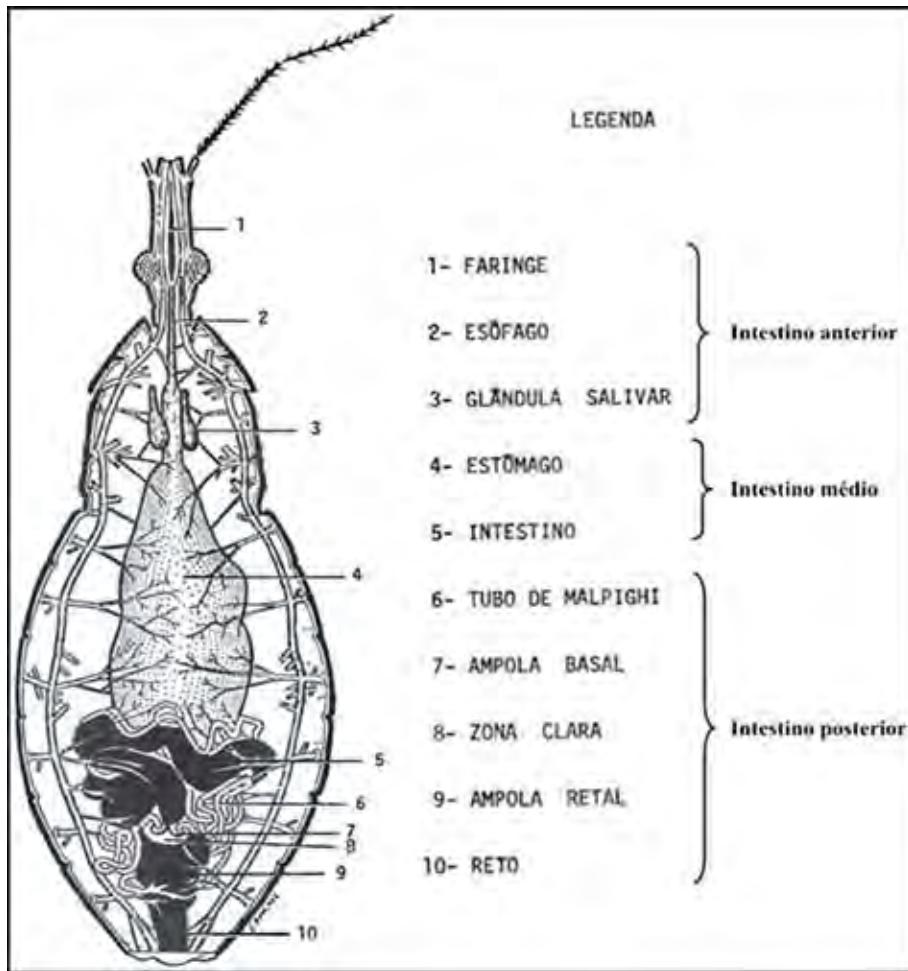


Figura 24: Sistema digestivo e respiratório de triatomíneo.

Figura adaptada por Teresa Cristina M. Gonçalves.

Fonte: LACOMBE, D. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). Parte XXI: Estudo comparado do sistema traqueal em *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 63, p. 65 - 105, 1965.

6.2 SISTEMA RESPIRATÓRIO

A oxigenação dos tecidos dos triatomíneos é feita pelo sistema traqueal. Esse inicia-se por pequenas aberturas na superfície ventral externa do tórax e do abdômen, chamadas espiráculos, que têm continuidade na hemocele com tubos denominados traqueias. Essas, por sua vez, ramificam-se em tubos de calibre menor, as traquéolas, que envolvendo os órgãos, conduzem o oxigênio até as células (Lacombe 1965) (Figuras 24 e 26).

6.3 SISTEMA CIRCULATÓRIO

O sistema circulatório é constituído, principalmente por sangue, tecidos e órgãos que auxiliam na distribuição sanguínea por todo o corpo. Nos vertebrados, o sangue percorre somente vasos especiais (artérias, capilares e veias) por isso, é chamado de sistema fechado.

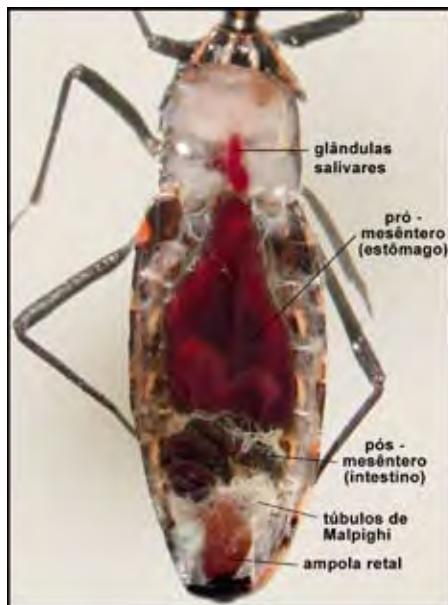


Figura 25: Sistema digestivo de *Rhodnius brethesi*.

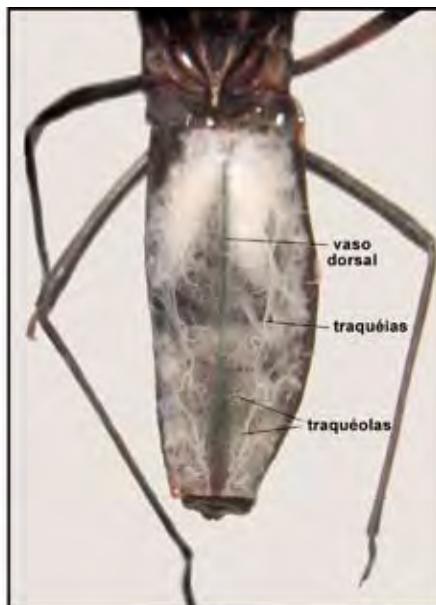


Figura 26: Sistema circulatório e respiratório de *Rhodnius brethesi*.

Fotos: Catarina Macedo.

Nos insetos, é um sistema aberto, porque o sangue circula por um vaso dorsal e livremente por toda cavidade do corpo, hemocele, irrigando assim os vários tecidos e órgãos. Esse vaso dorsal é um órgão especial bombeador, situado dorsalmente no corpo do inseto, que bombeia o sangue da porção posterior do corpo para a porção anterior, de onde passa à cavidade interna da cabeça. Dessa cavidade, o sangue circula por todo o corpo, em direção à região posterior onde novamente entra no vaso dorsal e é bombeado para frente, repetindo o ciclo.

6.3.1 SANGUE

O fluido que circula por toda cavidade do corpo do inseto é chamado hemolinfa. Ele consiste numa parte líquida, o plasma, e numa seleção de células livres chamadas hemócitos.

6.3.2 VASO DORSAL

O vaso dorsal se estende por todo comprimento do corpo do inseto, desde a região posterior do abdômen até a cabeça. É o órgão pulsátil responsável pela circulação do sangue junto aos músculos transversais e longitudinais (Figura 26).

O vaso dorsal é dividido em duas partes: uma porção posterior, chamada coração, e uma porção anterior, chamada de aorta. Em geral, o coração é a porção pulsátil e a aorta é o tubo por onde o sangue circula até ser liberado dentro da cabeça, causando a circulação.

O coração é mais ou menos dilatado em cada segmento para formar câmaras segmentais; cada câmara possui um par de aberturas laterais ou óstios, por onde o sangue entra na câmara. A aorta de forma tubular simples ocupa a região da cabeça, e também pulsa, causando a circulação.

7. CHAVES DICOTÔMICAS PARA A IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS (Lent & Wygodzinsky, 1979)

A zoologia tem como objetivo conhecer o reino animal. Para reunir os grupos de animais, são levados em consideração aspectos estruturais, tamanhos, proporções e coloração, dentre outros dados, baseados nas semelhanças encontradas entre os seres. Tal procedimento é feito através da classificação, conhecida também como Taxonomia ou Zoologia Sistemática.

Dessa forma, para se classificar um animal seja em nível de Classe, Ordem, Família, Gênero ou Espécie, utiliza-se um instrumento denominado Chave Dicotômica. Esta é formada por descrições de estruturas da morfologia externa de modo a orientar o usuário a percorrê-la em busca da identificação.

Esse caminho é feito seguindo uma numeração que orienta para duas opções a seguir, recebendo por isso, a denominação dicotômica, onde cada opção é denominada premissa. O final deste percurso ocorrerá quando se chegar a um nome de gênero ou espécie, dependendo do que se procura identificar.

É comum encontrar na literatura várias chaves dicotômicas, entretanto, a mais recomendada é a apresentada na presente apostila, e que pode ser encontrada na publicação de Lent & Wygodzinsky (1979), intitulada: "Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease".

Embora nesta obra o número total de espécies descritas seja de 111, em comparação com as 141 existentes atualmente, é a chave dicotômica mais completa, principalmente, porque é ilustrada. Desta forma, recomenda-se uma consulta aos artigos originais de descrição de novas espécies não incluídas, logo após a referida chave (página 230).

Na presente apostila, para facilitar o manuseio da chave dicotômica, foram selecionados e incluídos esquemas das morfologias externas e ilustrações referentes às espécies da Amazônia Legal (vide morfologia externa do triatomíneo).

CHAVE PARA OS GÊNEROS DE TRIATOMINAE COM BASE EM NINFAS DO PRIMEIRO ESTÁDIO

1. Quarto segmento antenal mais longo que o primeiro, o segundo e o terceiro reunidos (fig. 25A); mesonoto com a forma de estreita faixa transversal, mais curto que a metade do comprimento do pronoto (fig. 25D, H); superfície do corpo, antenas e patas com pêlos simples muito longos, eretos ou decumbentes (figs. 25K, H; 26C); fêmures com tricobótrias (fig. 26C) *Cavernicola*
Quarto segmento antenal mais curto que o primeiro, o segundo e o terceiro reunidos (figs. 24A-C; 25E); mesonoto mais longo na linha mediana do que dos lados e não mais curto que a metade do comprimento do pronoto (fig. 24A-D); superfície do corpo, na maioria dos casos, somente com pêlos curtos, alguns sendo espinhosos (fig. 24E-G); quando os pêlos são alongados mostram-se invariavelmente espinhosos (fig. 25B, J); fêmures sem tricobótrias 2
2. Fossetas esponjosas presentes nos três pares de patas *Parabellminus*, *Microtriatoma*¹
Fossetas esponjosas ausentes 3
3. Cabeça, tórax e patas pintados de claro e escuro, mosqueados; cerdas dos urotergitos muito curtas e irregularmente esparsas (fig. 24G) 4
Cabeça, tórax e patas de cor uniforme ou escura com anelações claras, porém nunca mosqueados; cerdas dos urotergitos, na maioria dos casos, dispostas em duas fileiras transversais (fig. 24A, F) 5
4. Cabeça alongada, conica; o comprimento da região anteocular com cerca do dobro da largura (fig. 24C); rostro delgado (fig. 24Q) *Rhodnius*
Cabeça curta e larga, região anteocular aproximadamente tão longa quanto larga (fig.

¹Não visto; caráter deduzido do quinto estádio ninfal.

Figura 27: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

24B); rostro robusto (fig. 25S)	<i>Psammolestes</i>
5. Rostro abreviado, não atingindo o prosterno (fig. 24H)	<i>Linshcosteus</i>
Rostro de comprimento normal, atingindo o prosterno (fig. 24I)	6
6. Pêlos do corpo e apêndices muito longos, eretos ou decumbentes (fig. 25B, C, E, G); ápice do segmento distal do tarso posterior sem pêlos especializados	<i>Paratriatoma</i>
Pêlos do corpo e apêndices sempre mais curtos do que na fig. 25B, C, E, G.; ápice do segmento distal do tarso posterior com (fig. 26E, F) ou sem (fig. 26A-D) pêlos especializados	7
7. Tarso posterior sem pêlos sensoriais especializados (fig. 26A-D)	8
Tarso posterior com pêlos sensoriais especializados (fig. 26E, F)	10
8. Cabeça muito curta, não mais longa que larga de lado a lado dos olhos ... <i>Alberprosenia</i> ²	
Cabeça mais longa que larga (figs. 24A, D)	9
9. Face inferior dos fêmures com dentículos setíferos conspicuos; região pós-ocular da cabeça de lados paralelos e abruptamente constricta adiante do pescoço (fig. 24D)	<i>Belminus</i>
Face inferior dos fêmures com tubérculos setíferos semelhantes aos demais; lados da região pós-ocular da cabeça arredondados e convergindo gradativamente para o pescoço (fig. 24A)	<i>Triatoma</i> (parte)
10. Rostro robusto ou delgado; se delgado, o primeiro segmento menor do que a metade do segundo (fig. 24P)	11
Rostro delgado, o primeiro segmento tendo mais do que a metade do segundo (fig. 24M)	<i>Eratyrus</i>
11. Terceiro segmento do rostro com um órgão rostral par (fig. 10D); comprimento mais do que 6 mm	<i>Dipetalogaster</i>
Terceiro segmento do rostro com órgão rostral par ausente; comprimento menos do que 6 mm	<i>Panstrongylus</i> ; <i>Triatoma</i> (parte)

O genero *Bolbodera* não está incluido por não termos material a nossa disposição.

Figura 28: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

CHAVE PARA OS GÊNEROS DE TRIATOMINAE COM
BASE EM NINFAS DO QUINTO ESTÁDIO

1. Corpo e apêndices com numerosos pêlos muito longos, eretos ou decumbentes (figs. 28A; 29F, I); cabeça fortemente convexa dorsalmente (fig. 29F, I); tubérculos anteniferos sem processo apical lateral; abdômen sem série de tubérculos no centro dos urotergitos (fig. 28A)²2
Corpo e apêndices sem pêlos muito longos, eretos ou decumbentes; cabeça fortemente convexa no dorso só em poucos casos (fig. 29J); tubérculos anteniferos com (fig. 27A, B, D) ou sem (figs. 27C; 28B) processo apical lateral; abdômen com ou sem série de tubérculos no meio dos urotergitos4
2. Todos os pêlos simples (como na figura 25H, K); olhos situados no meio da cabeça, lateralmente (fig. 29F); quarto segmento antenal mais longo que qualquer outro segmento (fig. 29F); terceiro e quarto segmentos antenais com anelações microscópicas; sulco estridulatório ausente; tarsos alongados, o anterior com cerca da metade do comprimento da tibia*Cavernicola*
Cerdas espinhosas (fig. 25J); olhos situados atrás do meio da cabeça, lateralmente (fig. 29I); quarto segmento antenal subigual no comprimento ao segundo ou terceiro (fig. 29F); somente o quarto segmento antenal com anelações microscópicas; sulco estridulatório presente; tarsos não alongados, o tarso anterior mais curto que a metade do comprimento da tibia3
3. Patas relativamente compridas e esbeltas (fig. 28A), os fêmures posteriores mais de oito vezes mais longos que largos; primeiro artísculo do rostro com duas vezes o comprimento do último*Panstrongylus* (parte)
Patas curtas e robustas (como na figura 28B), os fêmures posteriores menos de seis vezes mais longos que largos; primeiro segmento do rostro com menos de duas vezes o comprimento do último (1:0.7) ...*Paratriatoma*

²Não visto; caráter deduzido do quinto estádio ninfal.

Figura 29: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- Genas não ultrapassando ou somente apenas ultrapassando o nível do ápice do clípeo (fig. 29E, G, J, L-Q); tubérculos anteriores com ou sem processo apical lateral conspicuo; abdômen com ou sem série de quatro ou cinco tubérculos ao longo da linha mediana dorsal 8
5. Fêmures sem espinhos ou dentículos na face inferior; fosseta esponjosa presente nas tibias de todos os pares de patas; tórax não granuloso, com numerosas cerdas curtas escamas *Microtriatoma*
 Fêmures com processos espiniformes conspicuos na face inferior; tibias com ou sem fosseta esponjosa; tegumento dorsal fortemente granuloso 6
6. Primeiro e segundo segmentos do rostro de comprimento subigual (fig. 29H); tibias sem fosseta esponjosa *Belminus*
 Primeiro segmento do rostro muito mais curto que o segundo; fossetas esponjosas ausentes ou presentes 7
7. Genas espiniformes; fossetas esponjosas ausentes; tarsos alongados, várias vezes mais longos que o diâmetro apical da tibia *Bolbodera*¹
 Genas lameliformes, achatadas lateralmente, o ápice arredondado quando visto de lado; fosseta esponjosa presente em todas as patas; tarsos muito curtos, aproximadamente tão longos quanto o diâmetro apical da tibia *Parabelminus*
8. Comprimento até 5 mm; colorido geral píleo ou preto; cabeça delicadamente granulosa, curta e muito larga (fig. 29P), não mais comprida que larga de lado a lado dos olhos; terceiro segmento do rostro somente com a metade do comprimento do primeiro (como na fig. 320B); fêmures fusiformes, não achatados lateralmente *Alberprosenia*
 Mais de 5 mm de comprimento; cabeça mais longa que larga de lado a lado dos olhos; caracteres restantes variados 9

Figura 30: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

9. Cabeça, curta e larga, lisa (fig. 29Q); calosidades laterais pós-oculares muito salientes, com cerca de quatro quintos de largura do olho (fig. 29Q); sulco estridulatório tendo de comprido menos do dobro de sua largura (fig. 12D); rostro fortemente achatado dorso-ventralmente; pronoto liso; fêmures alargados, achatados lateralmente; abdômen granuloso, mas sem grandes tubérculos ao longo da linha mediana dorsal *Psammolestes*
Cabeça diferente; calosidade lateral pós-ocular saliente ausente; sulco estridulatório, quando presente, tendo de comprimento mais do dobro da largura (fig. 12A, C, E); caracteres restantes variados 10
10. Cabeça alongada (fig. 29O); tubérculos anteniferos situados no terço ou quarto anterior da região anteocular (fig. 29O); abdômen granuloso no dorso, mas sem a fileira de tubérculos medianos *Rhodnius*
Cabeça alongada ou curta; tubérculos anteniferos situados atrás do quarto anterior da região anteocular (fig. 29D, E, G, J, L-N); abdômen com ou sem série de tubérculos medianos dorsais 11
11. Rostro abreviado, não se prolongando para trás do nível dos olhos (como na figura 24H); sulco estridulatório não desenvolvido *Linchcosteus*
Rostro de comprimento normal, atingindo o prosterno (fig. 29D-J); sulco estridulatório presente 12
12. Rostro com primeiro e segundo segmentos alongados, de comprimento subigual, o terceiro curto (fig. 29G); abdômen com uma série de cinco tubérculos medianos dorsais salientes *Eratyrus*
Rostro com o primeiro segmento invariavelmente mais curto que o segundo (fig. 29D-F, H-J); abdômen com ou sem série de tubérculos medianos dorsais 13
13. Cabeça curta, larga (fig. 29J, M); tubérculos anteniferos situados atrás do meio da região anteocular *Panstrongylus* (parte)
Cabeça longa e estreita; tubérculos anteniferos situados ao nível do meio da região anteocular ou adiante dele (fig. 29D, E, L, N) ... 14

¹Não visto, caráter deduzido do adulto.

Figura 31: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

14. Genas pontudas, ultrapassando nitidamente o nível do ápice do clípeo (fig. 29N); terceiro e quarto segmentos antenais com diminutas anelações; abdômen, no dorso, sem séries de tubérculos medianos; tamanho maior que 25 mm *Dipetalogaster*
 Genas afiladas ou arredondadas apicalmente, não ultrapassando ou só ligeiramente ultrapassando o ápice do clípeo (fig. 29L); só o quarto segmento antenal anelado; abdômen, no dorso, com ou sem séries de tubérculos medianos; tamanho 25 mm ou menos
 *Triatoma*

**CHAVE PARA OS TRIBOS E GÊNEROS DE
TRIATOMINAE**

1. Ocelos não elevados, situados ao nível do tegumento, inóspicos entre os granulos da cabeça (figs. 304, 305B; 310, 311F; 317, 318A), ou situados sobre ou próximo do sulco interocular (figs. 292, 293B) 2
 Ocelos situados em nítidas saliências do disco na região pós-ocular da cabeça (figs. 5C; 162B; 205A) 6
2. Cabeça na maioria dos casos alongada, subcônica, não fortemente convexa dorsalmente na vista lateral (figs. 297B; 305B; 311F; 318N-R); genas grandes, alongadas, projetadas para diante do nível do ápice do clípeo a uma distância igual a largura do clípeo (figs. 296, 297A; 304, 305D; 310, 313A; 317, 318D); tubérculos anteniferos implantados adiante do meio da região anteroocular da cabeça (figs. 297B; 305B; 313B; 318B) e com projeção lateral apical espinhosa; ocelos situados diretamente sobre o disco da região pós-ocular da cabeça (figs. 297A; 305D; 313A; 318A); sulco interocular obsoleto; cório com nervuras nítidas; tegumento do corpo fortemente rugoso e granuloso [Bolboderini] 3
 Cabeça ovóide, fortemente convexa dorsalmente na vista lateral (fig. 293C); genas menos inóspicas, não ultrapassando o nível do ápice do clípeo; tubérculos anteniferos implantados junto ao bordo anterior dos olhos (figs. 292, 293B, C) e sem processo apical

Figura 32: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- lateral setifero; ocelos situados sobre o sulco interocular ou imediatamente atrás dele; sulco inter-ocular fortemente curvado para trás e quase atingindo o nível do bordo posterior da cabeça (figs. 292, 293B, C); cório com nervuras obsoletas (figs. 291, 292); tegumento do corpo liso, mas com pêlos longos, numerosos e suberectos (figs. 292, 293B, C);
 [Cavernicolini] *Cavernicola*
3. Rostro com o primeiro segmento maior (fig. 300A) ou tão longo (fig. 302A) quanto o segundo; escutelo, na base, com 1+1 processos sublaterais triangulares (figs. 300D, 302B; 304, 305E); conexivo dorsal com nítida crista longitudinal sublateral (figs. 299, 302B; 304) *Belminus*
 Rostro com o primeiro segmento muito mais curto que o segundo (figs. 297B; 311F; 313B; 315A); escutelo sem processos sublaterais na base; conexivo dorsal plano ... 4
4. Escutelo trapezoidal, de bordo posterior reto, sem processo posterior (fig. 310, 311A); primeiro urotergito descoberto (fig. 310)
 *Parabelminus*
 Escutelo triangular, com processo apical posterior bem desenvolvido (figs. 296, 317); primeiro urotergito não exposto 5
5. Genas achatadas lateralmente (figs. 315A; 318A, B, I, N-R); fêmures sem espinhos (fig. 315F); tibias com fosseta esponjosa em todas as patas; tarsos com dois segmentos curtos, juntos com cerca de um quinto do comprimento das tibias (fig. 315F)
 *Microtriatoma*
 Genas espiniformes (fig. 297B); fêmures com espinhos (fig. 297C); fosseta esponjosa tibial ausente; tarsos com três segmentos, com cerca de um terço do comprimento das tibias (fig. 297C) *Bolbodera*
6. Cabeça com nítida calosidade lateral pós-ocular provida de tubérculos setiferos (figs. 5, 290A, C, D); antenas implantadas em tubérculos inseridos perto do ápice da cabeça (figs. 270, 278A, B; 287, 290B, C)
 [Rhodniini] 7

Figura 33: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- Cabeça sem calosidade lateral pós-ocular provida de tubérculos setíferos; antenas implantadas em tubérculos afastados do ápice da cabeça 8
7. Cabeça subtriangular, algo achatada, de comprimento nitidamente menor que o dobro da sua largura incluindo os olhos (figs. 286, 287A; 289); região pós-ocular muito curta, seu comprimento com um quarto a um terço da largura; segmento apical do rostro profundamente emarginado distalmente (fig. 10G); fêmures conspicuamente dilatados e achatados lateralmente (fig. 284B) *Psammolestes*
- Cabeça subcilíndrica, não achatada dorso-ventralmente, de comprimento com o dobro ou mais do dobro da sua largura incluindo os olhos (figs. 271, 272, 276, 277, 278A); região pós-ocular mais longa, pelo menos com a metade da largura; terceiro segmento do rostro pontudo no ápice (fig. 10F); fêmures alongados na maioria das espécies, subcilíndricos, nunca achatados lateralmente *Rhodnius*
8. Comprimento total até 5 mm; cabeça muito curta e larga, não mais longa que a largura de lado a lado dos olhos (fig. 310A); clipeo mais dilatado antes do meio (fig. 320A); hemélitros com pequeno ramo conectando a porção basal da R+M a Sc (fig. 320C) [Alberproseniini] *Alberprosenia*
- Mais do que 5 mm de comprimento; cabeça mais alongada, mais que a largura de lado a lado dos olhos; sem pequeno ramo conectando a porção basal da R+M a Sc [Triatomini] 9
9. Cabeça muito curta e larga (figs. 240, 241, 242A); tubérculos anteníferos inseridos muito perto, junto, do bordo anterior dos olhos (fig. 242C); cabeça e corpo glabros ou com pêlos achatados curtos. *Panstrongylus*
- Cabeça de forma variada, na maior parte dos casos subcilíndrica (figs. 95A, B; 162A, B); tubérculos anteníferos não inseridos na proximidade dos olhos (figs. 95B; 162B); em

Figura 34: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- raros casos, cabeça comparativamente curta e tubérculos anteníferos relativamente próximos dos olhos (fig. 250B), mas então cabeça e corpo com conspicuos pêlos longos semi-erectos (figs. 250A, B) 10
10. Rostro não ultrapassando, para trás, o nível dos olhos (fig. 200B); prosterno sem sulco estridulatório (fig. 15A) *Linchcosteus*
 Rostro atingindo o prosterno (fig. 4I); sulco estridulatório prosternal presente (fig. 13A) 11
11. Escutelo com processo apical (figs. 195A; 197; 198A) tão ou mais comprido que o corpo principal do escutelo, oblíquo, com a forma de forte espinho aguçado; rostro com o primeiro segmento muito longo, quase tão longo quanto o segundo, terminando ao nível do meio da distância entre o tubérculo antenífero e o bordo anterior do olho (figs. 195B; 198A) *Eratyrus*
 Escutelo com processo apical com aspecto diferente; rostro com o primeiro segmento nitidamente mais curto que o segundo, não ultrapassando o nível da inserção do tubérculo antenífero (fig. 4I) 12
12. Cabeça, corpo e apêndices com abundantes pêlos compridos, curvos, semi-erectos (fig. 250A, B); cabeça fortemente convexa dorsalmente (fig. 250B, C); olhos pequenos (fig. 250A-C, F); tubérculos anteníferos inseridos perto do bordo anterior dos olhos (fig. 250B, C); fêmures anteriores sem dentículos; fossetas esponjosas ausentes; comprimento 12,5 - 14,5 mm *Paratriatoma*
 Cabeça, corpo e apêndices parecendo lisos ou com pêlos curtos, ou somente os apêndices com pêlos compridos (fig. 68), porém menos numerosos que acima; cabeça menos convexa dorsalmente; olhos maiores (figs. 69B; 162A; 211B); tubérculos anteníferos inseridos no meio ou perto do meio da região ante-ocular da cabeça, afastados dos olhos (figs. 162A; 211B); fêmures anteriores na maioria das espécies com dois ou mais dentículos; fossetas esponjosas presentes ou ausentes; comprimento 9,5 - 42 mm 13

Figura 35: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

13. Espécie muito grande, com 33 - 44 mm de comprimento; fêmures não espinhosos; placas ventrais do conexivo invisíveis (fig. 211A); membrana conspicua, longitudinalmente pregueada, conectando as placas do conexivo aos urosternitos (fig. 210C); processo posterior do pigóforo curto, retangular transversalmente e truncado no ápice (fig. 211F); gênero monotípico e restrito ao sul da Baixa Califórnia (México) .. *Dipetalogaster*
 Espécies raramente com 33 mm ou mais, na maioria dos casos com menos de 30 mm de comprimento; fêmures espinhosos ou não; placas ventrais do conexivo nítidas (figs. 18B; 88), embora algumas vezes estreitas; lados do abdômen raramente membranosos, somente na fêmea micróptera (fig. 177C) de uma espécie com membrana conectando as placas dorsais e ventrais; processo posterior do pigóforo afilado para o ápice (figs. 21D; 162D); gênero com muitas espécies e largamente distribuído geograficamente *Triatoma*

CHAVE PARA AS ESPÉCIES DE *Triatoma*

1. Adultos micrópteros (figs. 177B, C; 179B); segundo segmento antenal com muitos pelos conspicuamente maiores do que o diâmetro do segmento (fig. 6G); cor geral castanho-escura ou preta, com o conexivo e as partes laterais adjacentes dos urômeros vermelhas, a área vermelha contínua ou interrompida por manchas negras entre as suturas intersegmentares *spinolai* (parte)
 Adultos macrópteros, raramente braquípteros .2
2. Patas com áreas claras e escuras bem distintas (figs. 44, 60D; 74, 75, 76C; 88, 90B; 106, 119, 120, 166, 174, 175, 176C; 181, 182) 3
 Patas com todos os segmentos, exceto os tarsos, de colorido uniforme, que é escuro na maior parte dos casos; muito raramente, os fêmures com mancha muito pequena apical ou anel de colorido claro 11
3. Pronoto preto com os bordos laterais e carenas submedianas vermelhos (figs. 181, 182); tibias amarelas exceto no ápice escuro, contrastando acentuadamente com os fêmures pretos *tibiamaculata*

Figura 36: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

- Pronoto de cor diferente ou inteiramente preto;
colorido das patas não como acima 4
4. Espécie grande, 28 mm de comprimento; região
ante-ocular quase cinco vezes tão longa
quanto a pós-ocular (figs. 106, 107A); pro-
noto (fig. 106) castanho com 1+1 manchas
amareladas junto aos ângulos humerais;
fêmures e tibias de colorido castanho-alaran-
jado claro, os primeiros com anelação sub-
apical castanho-escura; conexivo com marcas
transversais estreitas escuras sobre as suturas
intersegmentares (fig. 107C, D)
..... *matogrossensis*
- Espécies de tamanho variado; cor das patas e do
pronoto diversa da de acima 5
5. Manchas escuras do conexivo no centro de cada
segmento (figs. 119, 120, 166) 6
- Manchas escuras do conexivo abrangendo as
suturas intersegmentares (figs. 43, 44, 59,
74, 75, 87, 89, 174, 175) 7
6. Fêmures de colorido castanho-alaranjado claro
com anel apical escuro; pronoto (fig. 166)
sem elementos coloridos conspícuos;
hemélitos escuros, somente com a base e o
ápice do cório claros (fig. 166); disco dos
segmentos conexivais com mancha escura
simples *ryckmani*
- Fêmures escuros, com anel apical claro (figs.
119, 120); pronoto e hemélitos com marcas
coloridas conspícuas, porém complexas (figs.
119, 120); disco dos segmentos conexivais
com mancha escura central em forma de
bigorna ou com duas pequenas manchas es-
curas (figs. 119, 120) *nigromaculata*
7. Pronoto inteiramente preto; patas pretas, com os
trocanteres e a base dos fêmures em con-
traste amarelo (figs. 60D; 90B) 8
- Pronoto inteiramente escuro ou com áreas
claras; patas não coloridas como acima 9
8. Marcas escuras transversais do conexivo com a
forma aproximada de notas musicais (figs.
59, 60D); cabeça mais longa que o pronoto
..... *deanei*
- Marcas transversais escuras do conexivo em
forma de faixas largas (figs. 87, 89); cabeça
tão longa quanto o pronoto *infestans*

Figura 37: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

9. Fêmures escuros com anelação clara (figs. 43A; 44); conexivo com manchas transversais escuras quase tão largas quanto os espaços claros intercalados e sem constrição mediana nítida (figs. 43, 44); espécie grande, com cerca de 25 mm ... *brasiliensis* (parte)
- Fêmures com áreas claras disseminadas e com anel escuro nítido subapical (figs. 74, 75, 76C; 174, 175, 176C); conexivo com manchas transversais escuras na maioria dos espécimes, muito estreitas, com nítida constrição mediana em forma de nota musical (figs. 74, 75, 174, 175, 176D-H); espécies menores, com não mais que 20,5 mm de comprimento 10
10. Lobo posterior do pronoto e escutelo uniformemente escuros (figs. 74, 75); coxas escuras (fig. 76C); rostro com o segundo segmento tendo menos do dobro do comprimento do primeiro (fig. 76B) *guasayana*
- Lobo posterior do pronoto com 1+1 manchas claras na região humeral (figs. 174, 175); ponta do processo apical do escutelo e das coxas claras; rostro com segundo segmento tendo mais do dobro do comprimento do primeiro (fig. 176B) *sordida*
11. Rostro com o terceiro segmento alongado, aproximadamente tão longo quanto o segundo (figs. 55C; 100B) 12
- Rostro com o terceiro segmento invariavelmente mais curto que o segundo 13
12. Áreas claras do conexivo vermelhas; olhos levemente menores e cabeça, de perfil, menos elevada posteriormente (fig. 55C) *circummaculata*
- Áreas claras do conexivo amarelas; olhos levemente maiores e cabeça, de perfil, mais elevada posteriormente (fig. 100B) *limai*
13. Antenas com primeiro segmento ultrapassando nitidamente o ápice do clípeo (fig. 162B); pronoto fortemente granuloso, de cor pícea ou preta com bordos laterais inteiramente vermelhos (figs. 159, 161) ... *rubrofasciata*
- Antenas com primeiro segmento muito poucas vezes ultrapassando nitidamente o ápice do clípeo, na maioria dos casos atingindo o nível do ápice do clípeo ou sendo mais curto; pronoto diferente do acima indicado 14

Figura 38: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

14. Rostro com primeiro segmento mais longo que o terceiro (figs. 36B; 93B; 131B; 148E; 180C, D; 188B) (em dúvida usar o item 53)	15
Rostro com primeiro segmento tão longo ou mais curto que o terceiro (figs. 66A; 79B; 105E; 146B; 158B; 165B)	53
15. Tegumento do corpo e cório dos hemélitos nitidamente piloso, pêlos facilmente perceptíveis no dorso (figs. 16, 93D; 142A, B)	16
Tegumento do corpo e cório praticamente glabros, no máximo com pêlos muito curtos e esparsos	21
16. Cabeça fortemente convexa dorsalmente (fig. 93B); tubérculos anteníferos alongados, mais próximos dos olhos (fig. 93B) . <i>lecticularia</i>	
Cabeça não fortemente convexa dorsalmente (fig. 142B); tubérculos anteníferos curtos, afastados dos olhos (fig. 142B)	17
17. Cório com extensa mancha branco-amarelada e de cor laranja na base, bem como preta no ápice (fig. 130) <i>pallidipennis</i>
Cório sem a extensa área branca, acentuadamente de cor preta com manchas amarelas ou vermelho-alaranjadas restritas à base e ao subápice (figs. 101, 109, 140, 141, 143)	18
18. Cório dos hemélitos com pêlos longos, deicados e suberectos, com cerca de 0,5 mm de comprimento	19
Cório com cerdas curtas decumbentes ou deitadas, algumas vezes achatadas, com não mais que 0,3 mm de comprimento (fig. 16A)	20
19. Hemélitos curtos, não ultrapassando o sexto urotergito (figs. 140, 141); conexivo dorsal com manchas vermelho-alaranjadas ocupando parcialmente um sexto a um terço posterior de cada segmento (fig. 142C-E)	
<i>phyllosoma</i>	
Hemélitos longos, cobrindo todo ou quase todo o abdômen (fig. 108); conexivo dorsal com manchas vermelho-alaranjadas ocupando de um terço a metade posterior de cada segmento (fig. 109) <i>mazzottii</i>

Figura 39: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

20. Genas atingindo ou ultrapassando o nível do ápice do clípeo (fig. 144A, B); lobo posterior do pronoto extensamente amarelo-alaranjado (fig. 143); na maioria dos espécimes, os segmentos do conexivo dorsal extensamente amarelo-alaranjados e com mancha preta ântero-lateral (fig. 144G); raramente, os segmentos do conexivo dorsal pretos com mancha amarelo-alaranjada pôstero-lateral (fig. 144D-F); mesosterno, metasterno e face ventral do abdômen sempre com longos pêlos suberectos *picturata*
 Genas em muitos casos não atingindo o nível do ápice do clípeo (fig. 102D); pronoto com lobo posterior inteiramente preto (fig. 101) ou com 1+1 pequenas manchas claras sobre os ângulos humerais (fig. 102D); segmentos do conexivo dorsal pretos com mancha amarela ou amarelo-alaranjada ocupando o terço ou a metade posterior, estendendo-se ou não até a sutura conexival (fig. 102B, C, E); mesosterno com pêlos suberectos longos; metasterno e face ventral do abdômen com pêlos semelhantes ou com pêlos curtos e decumbentes *longipennis*
21. Disco do escutelo, na base, com 1+1 tubérculos proeminentes, dirigidos para diante e atingindo o bordo posterior do pronoto (figs. 70B; 126D); ângulos humerais explanados (figs. 70B; 126D) 22
 Disco do escutelo sem os mencionados tubérculos basais; ângulos humerais não explanados 23
22. Cor geral castanho clara (fig. 70A); tubérculos discais e laterais do lobo anterior do pronoto muito salientes (fig. 70B); fêmures dos primeiro e segundo pares de patas com dentículos *flavida*
 Cor geral castanho muito escura (fig. 125); tubérculos discais e laterais do lobo anterior do pronoto não salientes (fig. 126D); fêmures anteriores e medianos sem dentículos *obscura*
23. Hemélitos de cor uniformemente castanho enfumaçada (figs. 177A; 179A); segundo segmento antenal com numerosas cerdas algumas vezes tão longas quanto o diâmetro do segmento (fig. 6G); pronoto sem

Figura 40: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

tubérculos discais; processo apical do escutelo extremamente curto (fig. 179A); metasterno carenado mediana e longitudinalmente (figs. 178, 180A); urotergitos inteiros, ausentes as suturas dorsais do conexivo	<i>spinolai</i> (parte)
Combinação diferente de caracteres	24	
24. Conexivo dorsal uniformemente colorido	25	
Conexivo dorsal com distintas áreas claras e escuras	29	
25. Espécies uniformemente claras (figs. 34, 35, 151, 152), castanho-alaranjadas; largura da parte basal da célula externa da membrana dos hemélitos maior do que a da célula interna (figs. 34, 35, 151, 152)	26	
Espécies uniformemente de cor castanha ou preta (figs. 134, 135, 147, 170); largura da parte basal da célula externa da membrana dos hemélitos aproximadamente igual à da célula interna (figs. 135, 147B, C; 170)	27	
26. Cabeça fortemente convexa no dorso (fig. 36B); genas atingindo o nível do ápice do clípeo (fig. 36A); olhos muito pequenos; distância interocular dorsal com quatro vezes a largura do olho (fig. 36A); fêmures sem dentículos; espécie pequena, com 15 mm de comprimento	27	<i>amicitiae</i>
Cabeça subcilíndrica (fig. 153B); genas ultrapassando o nível do ápice do clípeo (fig. 153A); olhos maiores; distância interocular dorsal somente com cerca do dobro da largura do olho (fig. 153A); fêmures com dentículos; espécie maior, com cerca de 24 mm de comprimento		<i>pugasi</i>
27. Cabeça com delicada depressão arqueada atrás do clípeo (fig. 148A, B, C); longa quando vista de perfil; olhos junto ao nível da face inferior da cabeça (fig. 148E); comprimento total 15-22 mm		<i>protracta</i>
Cabeça sem depressão arqueada atrás do clípeo (figs. 136A; 171A, C); relativamente muito mais curta quando vista de perfil; olhos afastados do nível da face inferior da cabeça (figs. 136B; 171B); comprimento total 9,5-13 mm	28	

Figura 41: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

28. Colorado geral preto (fig. 134) *peninsularis*
 Colorado geral castanho, polido (fig. 170) *sinaloensis*
29. Cor geral (fig. 51) amarelo-pálido incluindo as patas; primeiro segmento antennal amarelo-pálido, o segundo enegrecido (figs. 51, 52E); cório amarelo claro, com mancha central escura diminuta ou quase imperceptível; segmentos do conexivo (figs. 51, 52D) com mancha central escura adjacente à sutura interna do conexivo, mas não atingindo a margem externa ou as suturas anterior e posterior dos segmentos do conexivo; superfície da face ventral do abdômen com rugas diminutas *cavernicola*
 Combinação diferente de caracteres 30
30. Conexivo dorsal com área clara contínua no bordo externo (figs. 39, 46, 47, 82, 154, 156, 158C); o colorido escuro dos urotergitos continuando-se sobre a parte interna do conexivo, às vezes estendendo-se até o centro de cada segmento 31
 Segmentos do conexivo com regiões transversais claras e escuras alternadas, ambas tomando toda a largura dos segmentos (figs. 63, 94, 113, 115, 122A; 149, 168, 186) 35
31. Lobo anterior do pronoto sem tubérculos discrais (fig. 40A); região pós-ocular da cabeça nitidamente arredondada lateralmente, na vista dorsal (figs. 40A, G; 83A; 158A) 32
 Lobo anterior do pronoto com 1+1 tubérculos discrais (figs. 47, 155A); região pós-ocular da cabeça com os lados não arredondados, na vista dorsal (figs. 47, 48A; 155A) 34
32. Processo apical do escutelo curto, subconico (figs. 39, 82); primeiro segmento antennal terminando bem antes do nível do ápice do clípeo (figs. 40A-C; 83A) 33
 Processo apical do escutelo alongado, subcilíndrico (fig. 156B, C); primeiro segmento antennal atingindo o nível do ápice do clípeo (fig. 158A) *rubida* (parte)
33. Clípeo com a base fortemente dilatada (fig. 83A), sua superfície superior muito convexa na vista lateral (fig. 83B); superfície inferior da cabeça sinuosa na vista lateral (fig. 83B);

Figura 42: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

- face ventral do abdômen uniformemente arredondada *incrassata*
 Clípeo menos saliente, sua superfície superior somente muito levemente convexa, quando em vista lateral (fig. 40B, C); superfície inferior da cabeça quase reta na vista lateral (fig. 40B, C); face ventral do abdômen levemente achatada longitudinalmente na linha mediana *barberi* (parte)
34. Antenas com numerosos pêlos muito longos, além dos curtos, no segundo segmento (como na figura 6G); mesosterno limitado posteriormente por carena transversal conspicua (como nas figuras 178, 180); fêmures inermes; conexivo com áreas amareladas; espiráculos junto ao bordo conexival; comprimento cerca de 21 mm *breyeri* (parte)
 Antenas com segundo segmento só com pêlos curtos; mesosterno contínuo com o metasterno; fêmures com dentículos; conexivo com áreas vermelho-alaranjadas ou amareladas junto ao bordo externo; espiráculos afastados do bordo conexival; comprimento 25-33 mm *recurva*
35. Manchas pretas do conexivo incluindo as suturas intersegmentares (figs. 94, 186) .. 36
 Manchas pretas do conexivo não incluindo as suturas intersegmentares (figs. 63, 113, 115, 122A; 149, 168) 38
36. Pronoto e, geralmente, cório inteiramente pretos; cabeça mais longa que o pronoto *lenti*
 Pronoto e cório pretos, com manchas avermelhadas ou amareladas; cabeça tão longa ou mais curta que o pronoto 37
37. Preto com marcas vermelhas como a seguir (figs. 186, 187): faixa longitudinal dorsal na cabeça desde atrás do clípeo até o sulco interocular, 3+3 manchas alongadas no lobo posterior do pronoto, sendo 1+1 entre as carenas submedianas e 2+2 entre estas e os bordos laterais, e, sobre a depressão central do escutelo; pleuras e superfície inferior do tórax e abdômen opacos *vitticeps*
 Preto com 1+1 manchas amareladas pequenas no lobo posterior do pronoto situados entre as carenas submedianas e os bordos laterais na parte anterior do lobo; restante do pronoto e escutelo pretos (figs. 110, 111); pleuras e

Figura 43: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

- superfície inferior do tórax e abdômen fortemente polidos *melanocephala*
38. Manchas pretas dos segmentos do conexivo situadas anteriormente e adjacentes às suturas intersegmentares (figs. 63, 113, 168); área clara ocupando a parte posterior de cada segmento 39
- Manchas pretas do conexivo situadas no centro de cada segmento (figs. 115, 122A; 149), as partes anteriores e posteriores sendo claras 45
39. Lobo anterior do pronoto sem tubérculos discais (fig. 140); escutelo com processo apical curto, subcônico (fig. 39); conexivo dorsal com manchas vermelho-alaranjadas de forma irregular situadas de um quarto até a metade posterior de cada segmento (fig. 40E, F) incluindo parcialmente as respectivas suturas intersegmentares; em alguns casos a área vermelha se estende ininterruptamente sobre toda a margem externa do conexivo, ocasionalmente com um ponto escuro nos ângulos ântero-externos dos segmentos (fig. 40D) *barberi* (parte)
- Lobo anterior do pronoto com tubérculos discais (figs. 64A, D; 73A; 81A; 85A); processo apical do escutelo longo, cilíndrico (figs. 63, 72, 80, 84, 114A; 168) 40
40. Pronoto escuro (fig. 168) com manchas vermelhas ou amarelas em faixa estreita que acompanha o colarinho, os ângulos ântero-laterais, os bordos laterais do pronoto, alargando-se sobre os ângulos humerais e parte do bordo posterior; manchas claras do conexivo (fig. 168) ocupando o terço posterior de cada segmento, dorsal e ventralmente *sanguisuga*
- Pronoto uniformemente escuro, sem manchas, às vezes a área humeral levemente clara 41
41. Ângulos humerais do pronoto aguçados (figs. 113, 114A, C) *mexicana*
- Ângulos humerais arredondados (figs. 64A, D; 73A; 85A) 42
42. Cório dos hemélitos (fig. 63) preponderantemente amarelo ou amarelo-alaranjado com mancha escura apical e outra central, esta de tamanho variável e em alguns casos ausente; conexivo (fig. 63) dorsal e ventral com mancha amarela ou amarelo-alaranjada em mais

Figura 44: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- da metade posterior de cada segmento *dimidiata*
- Cório preponderantemente castanho-escuro a preto (figs. 72B; 80, 84); manchas claras do conexivo estreitas (figs. 72B; 80, 84) ... 43
43. Conexivo dorsal e ventral com mancha amarela ou amarelo-alaranjada em faixa transversal irregular estreita no quarto ou terço posterior de cada segmento junto à sutura intersegmentar (fig. 72B); corio com pequena mancha amarela na base e outra subapical (fig. 72B) *gerstaeckeri*
- Conexivo dorsal e ventral quase totalmente escuros, com mancha clara apenas visível como faixa estreita incompleta no limite posterior dos segmentos, também abrangendo as suturas intersegmentares (figs. 80, 84) ... 44
44. Lados da região pós-ocular da cabeça sub-paralelos, convergindo levemente para trás (fig. 81A); cório com mancha amarela basal e outra transversal subapical (fig. 80); tamanho, cerca de 28 mm *hegneri*
- Lados da região pós-ocular da cabeça nitidamente convexos (fig. 85A, C); cório quase inteiramente escuro, só algumas vezes mais claro junto ao clavo (fig. 84); tamanho, menos do que 20 mm *indictiva*
45. Pronoto e cório inteiramente escuros 46
- Pronoto e cório escuros com manchas claras .. 48
46. Segundo segmento das antenas com cerdas rígidas, não nitidamente maiores que o diâmetro do segmento; depressão mediana do escutelo triangular, bem definida pelas carenas laterais; segundo segmento do rostro subcilíndrico (fig. 58B) *rubida* (parte)
- Segundo segmento das antenas com cerdas rígidas tendo de comprimento mais do dobro do diâmetro do segmento (figs. 47, 68); depressão mediana do escutelo mal definida ou ausente (figs. 47, 68); segundo segmento do rostro nitidamente achatado no sentido dorso-ventral (figs. 48B; 69A) 47
47. Ângulos humerais arredondados (figs. 46, 47); processo posterior do escutelo tão longo quanto o corpo principal do esclerito (fig. 46); manchas claras do conexivo, na maioria dos espécimes, amarelas e ocupando a maior parte da superfície do conexivo incluindo

Figura 45: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- todo o seu bordo externo (figs. 46, 47) *breyeri* (parte)
- Ângulos humerais agudos ou pontudos (figs. 67, 68); processo posterior do escutelo mais curto do que o corpo principal do esclerito (fig. 68); manchas claras do conexivo de cor amarelo-laranja, raramente amarelo-pálida, alternando com manchas pretas transversais que se estendem em toda a largura das placas conexivais (figs. 67, 68) *eratyrusiformis*
48. Pronoto subquadrado (figs. 117, 118A; 122); genas não ultrapassando o nível do ápice do clípeo (figs. 118A, C; 122B; 124A); ápice do segundo segmento do rostro e quase a totalidade do terceiro segmento com pelos longos e densos (figs. 118B, D; 124C) 49
- Pronoto nitidamente trapezoidal (figs. 41, 96, 97A; 115, 172); genas ultrapassando o ápice do clípeo; todos os segmentos do rostro somente com pelos dispersos (figs. 42B; 97B; 116B; 173B) 50
49. Insetos maiores, com 19,5 - 22,5 mm de comprimento; cabeça com áreas claras dorsais de tamanho diverso (fig. 122B); região pós-ocular da cabeça suavemente arredondada e com os bordos convergindo nitidamente para trás (figs. 122B; 124A); pronoto preto, amarelado ao longo dos bordos anterior e laterais, sobre os ângulos humerais e em faixas curvas do lobo anterior (fig. 122) *nitida*
- Insetos menores, com 16,5 - 19,5 mm de comprimento; cabeça inteiramente preta dorsalmente (figs. 117, 118A); região pós-ocular da cabeça distintamente arredondada nos lados (fig. 118A, C); pronoto totalmente escuro mas com 1+1 manchas claras sobre os ângulos humerais (figs. 117, 118A) *neotomae*
50. Pronoto preto, com os bordos laterais, o bordo anterior e os ângulos ânterolaterais, as elevações do lobo anterior, as carenas submedianas do lobo posterior e uma faixa longitudinal mediana, castanho-amarelada (fig. 172) *sinica*
- Colorido do pronoto diferente 51

Figura 46: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

51. Ângulos ântero-laterais do pronoto de ponta arredondada (figs. 42A; 115, 116A); pronoto vermelho com 2+2 manchas pretas alongadas no lobo posterior (figs. 41, 115) 52
 Ângulos ântero-laterais do pronoto cónicos e com ápice pontiagudo (figs. 96, 97A); pronoto vermelho com 1+1 manchas pretas alongadas no lobo posterior (fig. 96) *leopoldi*
52. Largura do olho com mais da metade da distância interocular dorsal (fig. 116A); ângulos ântero-laterais do pronoto, na maioria dos casos, grandes e digitiformes (fig. 115); espécie grande, com 22-25 mm *migrans*
 Largura do olho com menos da metade da distância interocular dorsal; ângulos ântero-laterais do pronoto curtos, não digitiformes (fig. 42A); espécie menor, com 17-20 mm *bouvieri*
53. Segmentos do conexivo (figs. 156B, C; 158D, E) cada qual com mancha posterior transversal de colorido avermelhado pálido junto à sutura intersegmentar e, em vários casos, de cor pálida ao longo de toda a margem externa; pronoto não granuloso, castanho-avermelhado a preto, com bordos laterais e áreas humerais de cor laranja avermelhada pálida, raramente totalmente preta; primeiro segmento antenal atingindo ou ultrapassando ligeiramente o nível do ápice do clípeo (fig. 158A) *rubida* (parte)
 Conexivo diferente; pronoto uniformemente preto ou com manchas no disco; primeiro segmento antenal na maioria das espécies não chegando a atingir o nível do ápice do clípeo, somente muito raramente atingindo o nível do ápice do clípeo (*T. brasiliensis*), caso em que as suturas intersegmentares do conexivo estão incluídas em marcas transversais pretas 54
54. Cabeça de comprimento igual ou menor que o do pronoto 55
 Cabeça de comprimento maior que o do pronoto 60

Figura 47: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

55. Superfície do corpo, cório e patas com numerosos pelos dourados deitados (figs. 61, 145); patas fortes (figs. 61, 145); células da membrana dos hemélitos castanho-claras com numerosas manchas escuras irregulares (figs. 61, 145) 56
 Superfície do corpo, cório e patas parecendo glabra; patas delgadas; células da membrana dos hemélitos de cor castanho-clara uniforme 57
56. Pêlos das tibias posteriores (fig. 146D) mais curtos que o diâmetro do segmento, não perceptíveis sem aumento; corpo extremamente piloso; escutelo, na base, com 1+1 tubérculos salientes dirigidos para diante e atingindo o bordo posterior do pronoto (fig. 145) *platensis*
 Pêlos das tibias posteriores (fig. 62C) mais longos, tanto quanto o diâmetro do segmento, facilmente visíveis sem aumento; corpo menos piloso, escutelo sem os tubérculos conspicuos mencionados *delpontei*
57. Pronoto com tubérculos discrais e laterais no lobo anterior (figs. 103A; 104, 149) 58
 Lobo anterior do pronoto sem tubérculos discrais e laterais 59
58. Cabeça, na maioria dos casos, com manchas de colorido alaranjado no dorso, mais ou menos extensas; em muitos exemplares, mancha clara na propleura e na mesopleura (fig. 105E) ou só na mesopleura; cabeça muito alta atrás, quando vista de perfil (fig. 105B); olhos grandes (fig. 105A); rostro com primeiro segmento tão longo ou levemente maior que o terceiro, este com pêlos muito longos (fig. 105B); segundo segmento do rostro, visto de perfil, comparativamente mais grosso (fig. 105B); processo lateral do endosoma com faixas longitudinais largas e mais fortemente esclerosadas, sem dentículos no ápice (fig. 105D) *maculata*
 Cabeça sempre inteiramente preta no dorso; em muitos exemplares com mancha clara ausente ou presente somente na propleura; cabeça menos alta atrás, quando vista de perfil (150B); olhos menores (fig. 150A); rostro com o primeiro segmento levemente mais curto que o terceiro, este com pêlos

Figura 48: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

- mais curtos (fig. 150B); segundo segmento do rostro, visto de perfil, mais delgado (fig. 150B); processo lateral do endosoma sem cristas longitudinais largas e com dentículos no ápice (fig. 150D) *pseudomaculata*
59. Pronoto de colorido escuro uniforme (fig. 37); cório e clavo dos hemélitos quase totalmente escuros, excetuados os dois terços apicais do clavo e parte da célula corial adjacente, ambas castanho-enfumaçadas (fig. 37); processos do endosoma do macho fortemente esclerosados, no comprimento com mais da metade do falso-soma e com cerca de 100 dentículos no ápice (fig. 38C, D) *arthurneivai*
- Pronoto escuro, com 1+1 manchas avermelhadas nítidas nos ângulos humerais (figs. 192, 193A) e, em alguns espécimes, com larga mancha discal avermelhada entre as carenas, perto do bordo posterior; cório dos hemélitos (figs. 191, 192) com áreas avermelhadas grandes e confluentes; processos do endosoma fracamente esclerosados, no comprimento com não mais de metade do falso-soma e somente com cerca de 20 dentículos apicais (fig. 193D) *wygodzinskyi*
60. Elementos de cor escura do conexivo com a forma de faixas transversais largas bem nítidas 62
 Elementos de cor escura do conexivo muito reduzidos, não com a forma de faixas transversais largas 61
61. Cório dos hemélitos (figs. 56, 57) preto, com manchas alaranjadas apicais e também no clavo; conexivo inteiramente preto ao longo de sua parte interna, alaranjado na metade externa e interrompido por estreitas faixas negras sobre as suturas intersegmentares (figs. 56, 57, 58B, C) *costalimai*
 Cório dos hemélitos (fig. 189) inteiramente amarelo, exceto as nervuras, a base e o bordo externo do clavo, que são escuros; conexivo totalmente amarelo, exceto pequena mancha preta na margem externa sobre as suturas intersegmentares ou logo atrás delas (figs. 189, 190) *williami*
62. Pronoto preto, com bordos laterais e três faixas longitudinais do lobo posterior avermelhadas (figs. 49, 65A, B; 66C, D; 184, 185C); suturas intersegmentares do conexivo incluídas nas áreas claras 63

Figura 49: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

- Pronoto com áreas claras diferentes ou inteiramente pretas; conexivo com suturas intersegmentares incluídas nas áreas pretas (figs. 43, 44, 77, 78, 127, 128, 132, 133B, C; 137, 138, 163, 164) 65
63. Corpo com pilosidade dourada conspícuas; membrana dos hemélitros com elementos coloridos matizados (fig. 65); fêmures escuros com nódulos ferrugíneos e mais do que cinco dentículos setíferos na face inferior; conexivo (figs. 65, 66C, D) preto com duas manchas vermelho-alaranjadas em cada segmento, uma situada na parte posterior do segmento incluindo a sutura intersegmentar e ocupando toda a largura do segmento, e outra incompleta situada no centro do segmento e perto do bordo *dispar*
- Pilosidade do corpo inconspícuas; membrana dos hemélitros sem elementos matizados; fêmures sem nódulos e com não mais do que três dentículos na face inferior; conexivo de padrão diferente 64
64. Cabeça e patas castanho-avermelhadas; nervuras da membrana (fig. 184) de colorido nitidamente claro e marginadas de claro; ângulos ântero-laterais do pronoto subcilíndricos (fig. 185B); ápice do processo posterior do escutelo truncado arredondado; pleuras com áreas claras extensas *venosa*
- Cabeça e patas castanho-escuras ou pretas; nervuras da membrana menos salientes (fig. 49); ângulos ântero-laterais do pronoto achatados dorso-ventralmente (fig. 50A); ápice do processo posterior do escutelo em forma de colher (fig. 50D); pleuras praticamente de cor escura uniforme *carrioni*
65. Hemélitros (figs. 77, 78, 127, 128) completamente castanho-amarelados claro exceto a base do clavo e as nervuras, que são escuas; cório não mais escuro que a membrana 66
- Hemélitros parcialmente escurecidos, pelo menos parte do cório mais escuro que a membrana 67
66. Pronoto preto (figs. 127, 128), com 1+1 manchas amarelas nos húmeros; hemélitros curtos, pelo menos na fêmea, com o sétimo urotergito completamente exposto (figs. 127,

Figura 50: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- 128); olhos comparativamente pequenos, não atingindo o nível da face ventral da cabeça quando vista de perfil (fig. 119B); distância interocular dorsal com o dobro da largura do olho visto dorsalmente (fig. 129A); a maioria dos pêlos do terceiro segmento do rostro maiores que o diâmetro do segmento (fig. 129B); processo ápice do escutelo muito curto, oblique (fig. 129C) *oliveirai*
- Pronoto (figs. 177, 178) inteiramente preto; hemélitos normais, cobrindo completamente os sétimo e oitavo urotergitos (figs. 177, 178); olhos comparativamente grandes, ultrapassando o nível da face ventral da cabeça quando vista de perfil (fig. 79B); distância interocular dorsal com menos do dobro da largura do olho visto dorsalmente (fig. 79A); a maioria dos pêlos do terceiro segmento rostral mais curtos que o diâmetro do segmento (fig. 79B); processo apical do escutelo horizontal *guazu*
57. Membrana dos hemélitos uniformemente escura, com nervuras praticamente da mesma cor (figs. 132, 163, 164) 68
- Membrana clara, com áreas mais ou menos extensas distintamente mais escuras; nervuras nitidamente escuras (figs. 44, 137, 138) 69
58. Comprimento 21 mm ou menos; ápice dos fêmures (fig. 133E) com anelação amarela estreita; manchas do conexivo amarelas; pronoto uniformemente preto (fig. 132) *patagonica*
- Comprimento 21 mm ou mais; fêmures inteiramente pretos; manchas do conexivo de cor vermelha, laranja ou muito raramente amarela; pronoto raramente completamente preto, na maioria dos exemplares com manchas avermelhadas (fig. 165C, D, F-J) *rubrovaria*
59. Antenas com o primeiro segmento quase atingindo o nível do ápice do clípeo (fig. 45A); rostro com pêlos longos abundantes (fig. 45B); pronoto e escutelo inteiramente pretos (figs. 43B) *brasiliensis* (parte)
- Antenas com o primeiro segmento curto, seu ápice consideravelmente afastado do nível do ápice do clípeo (figs. 137-139); rostro (fig. 139B) com pêlos curtos isolados, pratica-

Figura 51: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

mente glabro; pronoto com manchas amareladas claras mais ou menos nítidas; processo apical do escutelo claro na ponta (fig. 138) *petrochii*

CHAVE PARA AS ESPÉCIES DE *Triatoma* DO BRASIL

1. Antenas com o primeiro segmento ultrapassando consideravelmente o ápice do clípeo (figs. 161, 162B); pronoto de cor picea ou preta, com os bordos laterais de cor vermelha em toda a extensão (figs. 159, 161); mancha clara do conexivo sobre as suturas intersegmentares e, em faixa estreita, adiante e atrás delas (fig. 161); abdômen nitidamente achatado mediana e longitudinalmente na face ventral *rubrofasciata*
Antenas com o primeiro segmento não atingindo ou apenas atingindo o nível do ápice do clípeo; pronoto totalmente preto ou com manchas de aspecto diverso; mancha escura do conexivo sobre as suturas intersegmentares ou em faixa larga imediatamente atrás delas; abdômen convexo ventralmente 2
2. Tibias de colorido claro uniforme, exceto o ápice (figs. 106, 181, 182) 3
Tibias de colorido escuro uniforme ou com anelação clara subapical 4
3. Fêmures predominantemente escuros (figs. 181, 182); mancha escura do conexivo em faixa transversal larga imediatamente atrás das suturas intersegmentares (figs. 181, 182); pronoto escuro com os bordos laterais, o bordo posterior, os ângulos ântero-laterais e 1+1 faixas centrais sobre as carenas e os tubérculos discrais, vermelho-alaranjados (figs. 181, 182) *sibiamaculata*
Fêmures predominantemente claros (fig. 106); conexivo com mancha escura estreita sobre as suturas intersegmentares (figs. 106, 107C, D), daf ampliando-se para os bordos interno e externo; pronoto castanho com 1+1 manchas amareladas na região ad-humeral (fig. 106) *matogrossensis*
4. Fêmures escuros e com áreas de manchas claras (figs. 43, 44, 59, 60D; 88, 90B; 174, 175, 176C); trocanteres claros, amarelados (figs. 60D; 90B; 176C) 5
Fêmures inteiramente, trocanteres parcialmente ou inteiramente escuros 8

Figura 52: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

5. Coxas claras (figs. 174, 175, 176C), como a maior parte dos fêmures; fêmures com anel castanho sub-apical e manchas irregulares na superfície dorsal (figs. 174, 175, 176C); pronoto castanho com 1+1 manchas amareladas nas regiões humerais (figs. 174, 175) *sordida*
 Coxas escuras, como a maior parte dos fêmures; fêmures e pronoto também de aspecto diferente para outros detalhes 6
6. Trocanteres e base dos fêmures amarelos (figs. 60D; 88, 90B); pronoto inteiramente preto (figs. 59, 87, 89) 7
 Trocanteres amarelos; fêmures claros na região sub-mediana, frequentemente anelados (figs. 43A; 44); pronoto castanho com 1+1 manchas amareladas sobre as carenas longitudinais, desde seu inicio no lobo anterior até o bordo posterior (figs. 43A; 44) *brasiliensis* (parte)
7. Marcas escuras transversais do conexivo em forma de faixas largas (figs. 87, 89); cabeça tão longa quanto o pronoto *infestans*
 Marcas escuras transversais do conexivo com a forma aproximada de notas musicais (fig. 59); cabeça mais longa que o pronoto *deanei*
8. Cabeça de comprimento maior que o do pronoto 9
 Cabeça de comprimento igual ou menor que o do pronoto 16
9. Rostro com terceiro segmento muito longo, aproximadamente do comprimento do segundo (fig. 55C); espécie pequena, com 16 mm de comprimento aproximadamente e manchas vermelhas *circummaculata*
 Rostro com terceiro segmento sempre menor que o segundo (figs. 45B; 188B); espécies maiores, com manchas de cor amarela, laranja ou vermelha 10
10. Antenas com primeiro segmento curto, bem afastado do nível do ápice do clípeo (figs. 56, 58A, C; 137-139, 189, 190A, B) 11
 Antenas com primeiro segmento atingindo ou quase atingindo o nível do ápice do clípeo (fig. 45A) 13
11. Pronoto escuro com manchas claras (figs. 137, 138); manchas claras e escuras do conexivo em forma de largas faixas transversais ocupando toda a largura do segmento (figs. 137,

Figura 53: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

- 138); rostro com cerdas muito curtas, espar-
sas, quase glabro (fig. 139B); membrana
com mancha escura sobre a nervura que se-
para as duas células (figs. 137, 138)
..... *petrochii*
- Pronoto inteiramente escuro (figs. 56, 57, 189);
manchas do conexivo diferentes; segundo e
terceiro segmentos do rostro com cerdas
longas e numerosas (figs. 58A; 190B); mem-
brana sem a mancha referida 12
12. Cório dos hemélitros preto com manchas alaran-
jadas ou avermelhadas na metade apical
(figs. 56, 57); conexivo (fig. 58B, D) preto e
de contorno externo alaranjado, fracamente
interrompido, ao nível das suturas interseg-
mentares, por estreita faixa negra, que é
mais nítida na face ventral; no limite interno,
com o abdômen, o conexivo é todo escuro
..... *costalimai*
- Cório dos hemélitros (fig. 189) quase totalmente
amarelado, excetuado o relevo das nervuras,
que são pretas; conexivo (figs. 189, 190C)
quase totalmente amarelo, excetuado pe-
quena mancha lateral externa preta sobre as
suturas intersegmentares, e, dorsal mas não
ventralmente com áreas muito reduzidas no
limite interno *williami*
13. Hemélitros curtos, deixando visível o sétimo
urotergito (figs. 127, 128); escutelo com
processo apical curto (fig. 129C), e total-
mente preto; cório e membrana totalmente
amarelados, com nervuras escuras e mem-
brana sem mancha central sobre as células
(figs. 127, 128) *oliveirai*
- Hemélitros atingindo a extremidade abdominal
(figs. 43, 44, 94, 163, 164); escutelo com
processo apical longo e horizontal (fig. 43);
cório e membrana com diferente conjunto de
caracteres 14
14. Cório dos hemélitros em geral totalmente preto
(fig. 94A, C); pronoto totalmente preto (fig.
94); manchas claras do conexivo amarelo-
alaranjadas *lenti*
- Cório dos hemélitros com manchas claras (fig.
43); pronoto totalmente preto ou manchado
de vermelho; manchas claras do conexivo
vermelhas ou amareladas 15

Figura 54: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

15. Rostro grosso, segundo e terceiro segmentos com pêlos longos muito abundantes (fig. 45B); pronoto totalmente preto, em alguns casos as carenas do lobo posterior são parcialmente amareladas (fig. 43B); manchas claras do conexivo amarelas; cório dos hemélitros com manchas amarelas *brasiliensis* (parte)
- Rostro delgado, pouca pilosidade nos segundo e terceiro segmentos (fig. 165B); pronoto com o lobo anterior totalmente preto e o posterior manchado de vermelho em extensão variável a totalmente preto; manchas do conexivo vermelhas (figs. 163, 164, 165C, D, F-J); cório dos hemélitros com manchas vermelhas irregulares, às vezes de cor laranja ou amarela *rubrovaria*
16. Genas não ultrapassando o ápice do clípeo (figs. 112, 188) ou apenas atingindo a seu nível; clípeo fortemente alargado sub-basalmente; segundo e terceiro segmentos do rostro com pêlos longos abundantes (figs. 112B; 188B); comprimento total 25 mm ou mais 17
- Genas ultrapassando nitidamente o nível do ápice do clípeo (figs. 38B; 105A; 150A, B; 193A); clípeo muito pouco alargado sub-basalmente; segundo e terceiro segmentos do rostro com pêlos muito curtos ou somente o terceiro com pêlos longos (figs. 38A; 105B; 150B, 193B); comprimento 22 mm ou menos 18
17. Preto com manchas vermelhas (figs. 186, 187); em faixa longitudinal dorsal na cabeça desde atrás do clípeo até o sulco interocular, em 3+3 manchas no lobo posterior do pronoto sendo 1+1 entre as carenas e 2+2 entre elas e os bordos laterais, como ainda na depressão central do escutelo; pleuras e face inferior do tórax e abdômen foscos *vitticeps*
- Preto (figs. 110, 111) com 1+1 manchas amarelas na metade anterior do lobo posterior do pronoto entre as carenas e os bordos laterais, mais próximo daquelas; preto na metade restante do pronoto e no escutelo; pleuras e face inferior do tórax e abdômen muito polidas *melanocephala*

Figura 55: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

18. Pronoto com tubérculos discais e laterais no lobo anterior (fig. 104); ângulos ântero-laterais de cor amarela clara (figs. 104, 149)
19. Pronoto sem tubérculos discais e laterais no lobo anterior; ângulos ânterolaterais de cor preta
19. Cabeça com mancha vermelho-alaranjada dorsal mais ou menos extensa em forma de Y (figs. 103A; 104), sobre o clípeo, as genas, as jugas e prolongando-se, às vezes, entre os olhos, muito raramente toda preta; cabeça muito elevada atrás, na vista lateral (fig. 105B); em muitos espécimes, mancha clara na propleura e na mesopleura (fig. 105E) ou só na mesopleura; olhos grandes; rostro (fig. 105B) com primeiro segmento levemente maior que o terceiro, este com pêlos muito longos; segundo segmento do rostro grosso, de perfil (fig. 105B); processo lateral do endosoma com largas faixas longitudinais fortemente esclerosadas e sem dentículos no ápice (fig. 105D) *maculata*
- Cabeça de colorido preto uniforme dorsalmente (fig. 149), sem mancha vermelha dorsal e menos alta atrás, na vista lateral (fig. 150B); manchas claras pleurais ausentes ou só presentes na propleura; olhos menores; rostro (fig. 150B) com primeiro segmento levemente mais curto que o terceiro, este com pêlos mais curtos; segundo segmento do rostro mais delgado, de perfil; processo lateral do endosoma sem faixas longitudinais e com dentículos no ápice (fig. 150D) *pseudomaculata*
20. Pronoto de colorido escuro uniforme (fig. 37); cório dos hemélitros (fig. 37) quase totalmente escuro, com a metade apical do clavo e parte da célula corial adjacente a ela, enfumaçadas como a membrana; processos do endosoma do macho (fig. 38C, D) fortemente esclerosados, com mais da metade do falosoma (de comprimento) e com cerca de 100 dentículos no ápice *arthurneivai*
- Pronoto escuro (figs. 191, 192) com 1+1 manchas avermelhadas nítidas nos ângulos humerais e, em alguns espécimes, com uma larga mancha avermelhada entre as carenas, perto do bordo posterior; cório (figs. 191, 192) dos hemélitros com manchas aver-

Figura 56: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

melhadas grandes e confluentes; processos do endosoma (fig. 193C, D) fracamente esclerosados, com não mais de metade do comprimento do falosoma e somente com cerca de 20 dentículos apicais. *wygodzinskyi*

CHAVE PARA AS ESPECIES DE *Eratyrus*

1. Lobo anterior do pronoto com 1+1 espinhos discrais fortes (figs. 197, 198A, E-G); ângulos humerais do pronoto nitidamente espinhosos (figs. 196, 197, 198A, H-N); cório com mancha subapical avermelhada comparativamente pequena, anteriormente não atingindo o nível da nervura transversa m-cu (figs. 196, 197, 198B-D); parte livre da vesica convexa no ápice, na vista lateral (fig. 195H) *mucronatus*
Lobo anterior do pronoto com 1+1 tubérculos discrais pouco elevados e arredondados no ápice (figs. 195A, B); ângulos humerais do pronoto (fig. 195A, B) apenas aguçados ou pontudos, mas não espinhosos; mancha subapical avermelhada do cório relativamente grande, atingindo ou ultrapassando anteriormente o nível da nervura transversa m-cu (figs. 194, 195F); parte livre da vesica achatada ou levemente côncava no ápice, na vista lateral (fig. 195G) *cuspidatus*

CHAVE PARA AS ESPECIES DE *Panstrongylus*

1. Processo apical do escutelo alongado, subcilíndrico, afilando para a ponta (figs. 215C; 217, 220, 223, 228, 238, 246, 247) 2
Processo apical do escutelo curto, arredondado, cônico ou truncado na ponta (figs. 226C; 231B, 235, 236D; 242D; 244) 9
2. Espécimes quase totalmente pretos (figs. 213, 214); lobo posterior do pronoto com manchas avermelhadas nos ângulos humerais e submedianamente no bordo posterior (fig. 215B), em alguns casos apenas perceptíveis; segmentos do conexivo dorsal com pequena mancha vermelha nos ângulos póstero-laterais (figs. 213, 214, 215D) *chinai*
Espécimes de coloração diferente 3
3. Abdômen ventralmente de cor clara, com séries longitudinais de manchas pretas (figs. 219, 221E) 4
Abdômen de colorido diferente, sem séries de manchas pretas 5

Figura 57: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

4. Comprimento maior do que 20 mm; cabeça, de perfil, comparativamente curta e forte (fig. 221B); pronoto com manchas pretas conspícuas (figs. 219A; 220); todos os segmentos do conexivo com manchas pretas e claras intercaladas (figs. 219, 220, 221E) *geniculatus*
- Comprimento menor do que 20 mm; cabeça mais delgada, de perfil (fig. 233C); pronoto sem manchas pretas distintas (fig. 232); segmentos do conexivo dorsal de cor clara, só o disco dos terceiro e quarto segmentos com pequena mancha preta cada um *lenti*
5. Rostro com o segundo segmento tão longo ou mais curto que o primeiro (fig. 248D, E) *tupynambai*
- Rostro com o segundo segmento constantemente maior que o primeiro (figs. 218C; 224B; 229B; 239B) 6
6. Cório amarelo, exceto na extrema base e subapicalmente (figs. 227, 228), contrastando fortemente com a membrana de cor cinza escuro; abdômen ventral preto, com o conexivo e as partes laterais dos urosternitos contrastando devido ao seu colorido amarelo (fig. 229C); distância interocular dorsal muito menor que o dobro da largura do olho visto dorsalmente (fig. 229A); fêmures com leves saliências subapicais, mas sem dentículos *howardi*
- Cório tão escuro quanto a membrana, com a base e o ápice de colorido mais claro (figs. 217, 222, 223, 237, 238); abdômen ventral uniformemente castanho-avermelhado; distância interocular dorsal com o dobro da largura do olho visto dorsalmente, ou mais do dobro (figs. 218A; 224A; 238, 239A); fêmures anteriores e medianos com vários dentículos conspicuos (figs. 218B; 224C, D; 238C) 7
7. Lobo anterior do pronoto com tubérculos discais bem desenvolvidos (figs. 238, 239) *lutzi*
- Lobo anterior do pronoto somente com tubérculos discais obsoletos ou sem eles (figs. 217, 218D; 223, 224E) 8
8. Ângulos ântero-laterais do pronoto muito curtos, apenas obtusos (fig. 218D); face superior da cabeça reta, quando vista de perfil (fig. 218C); fêmures anteriores e medianos com

Figura 58: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- dois a três dentículos cada um (fig. 218B); bordos laterais dos lobos anterior e posterior do pronoto constituindo uma linha praticamente contínua (figs. 216, 217, 218D) *diasi*
 Ângulos ântero-laterais do pronoto alongados, salientes (figs. 222, 223, 224B, E); cabeça, de perfil, nitidamente convexa em cima (fig. 224B); fêmures anteriores e médios (fig. 224C, D) com mais de três dentículos cada um; bordos laterais dos lobos anterior e posterior do pronoto formando ângulo nítido (figs. 222, 223, 224E) *guentheri*
9. Jugas obtusas (fig. 245B); tubérculos do lobo anterior do pronoto avermelhados; conexivo com mancha escura isolada no centro de cada segmento, bem como faixa transversal escura estreita adjacente ao bordo anterior do segmento (figs. 243, 244, 245J, K); tegumento dorsal do corpo com numerosas cerdas douradas deitadas; colorido geral dos hemélitos verde pálido ... *rufotuberculatus*
 Jugas curvadas em forma de gancho (figs. 226D; 231C; 236E; 242B, C); tubérculos do lobo anterior do pronoto não avermelhados ou raramente assim coloridos; conexivo com mancha escura grande na parte anterior de cada segmento, a parte posterior sendo clara (figs. 225, 230, 234, 235, 240, 241); tegumento do corpo praticamente glabro; cor geral dos hemélitos não esverdeada ... 10
10. Inseto preto com manchas vermelhas; terceiro segmento antenal distintamente menor que o segundo (fig. 242A); lobo posterior do pronoto preto com 2+2 manchas grandes de cor vermelha (figs. 240, 241) *megistus*
 Insetos amarelados ou castanho-amarelados com manchas amarelas complexas (figs. 225, 230, 234, 235); terceiro segmento antenal tão longo quanto o segundo; lobo posterior do pronoto de cor clara, com uma faixa mediana preta e 2+2 manchas sublaterais, longitudinais e estreitas, também pretas (figs. 226B; 230, 234, 235) 11
11. Escutelo amarelado, com faixa preta mediana longitudinal (fig. 230); processo posterior do escutelo com forte corcova basal (fig. 231B); lobo anterior do pronoto sem tubérculos sublaterais (fig. 231D) *humeralis*
 Escutelo preto com faixa amarela mediana longitudinal (figs. 226C; 234, 235); processo

Figura 59: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

- posterior do escutelo com leve corcova basal (fig. 236D); lobo anterior do pronoto sempre com tubérculos sublaterais, além dos tubérculos discais e laterais (figs. 226B; 236C) 12
12. Tibias pretas com pequena mancha sub-basal amerela (figs. 234, 235, 236B); cabeça relativamente curta; relação comprimento da cabeça para comprimento do pronoto = 1:1,3-1,4 *lignarius*
- Tibias inteiramente pretas (fig. 225); cabeça relativamente longa; relação comprimento da cabeça para comprimento do pronoto = 1:1,1-1,15 *herreri*

CHAVE PARA AS ESPÉCIES DE *Rhodnius*

1. Colorido geral da cabeça e das patas constituído de pequenas manchas e pontos irregulares que produzem aspecto sarapintado (figs. 257, 268, 269, 273, 274) 2
Colorido de cabeça e patas mais uniforme, sem as pequenas manchas irregulares causadoras do aspecto sarapintado (figs. 251, 254, 259, 262, 263, 266, 271, 276, 277, 279, 280) 4
2. Tibias de todos os pares de patas com anel submediano escuro (figs. 273, 274); olhos invariavelmente mais largos que a distância interocular dorsal (fig. 255A); conexivo dorsal com manchas retangulares escuras com forte projeção posterior em ponta, pelo menos nos segmentos 3 a 5 (figs. 273, 274); processo mediano do pigóforo profundamente bifurcado em dois espinhos (fig. 275D) *pictipes*
Tibias sem o anel escuro acima indicado (figs. 257, 268); olhos não mais largos que a distância interocular dorsal (figs. 258A; 269); conexivo dorsal com manchas retangulares escuras sem a projeção posterior em ponta (figs. 257, 268, 269); processo mediano do pigóforo não bifurcado (figs. 258C; 270C). 3
3. Espécie de tamanho grande, cerca de 22 mm de comprimento; cabeça proporcionalmente muito alongada, sensivelmente maior do que o pronoto (relação = 1:0,80-0,85), tão longa quanto o pronoto mais o escutelo sem seu processo apical (figs. 268, 270); região antecular com mais de três vezes o comprimento do escutelo *lateralis*

Figura 60: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- o pronoto (relação = 1:0,80-0,85), tão longa quanto o pronoto mais o escutelo sem seu processo apical (figs. 268, 270); região ante-ocular com mais de três vezes o comprimento da pós-ocular, na vista dorsal (figs. 269, 270A); manchas retangulares do conexivo dorsal bem constituídas (figs. 268, 269) *pallescens*
- Espécie de tamanho pequeno, cerca de 14 mm de comprimento; cabeça proporcionalmente mais curta, somente pouco maior que o pronoto (relação 1:0,90-0,95) (figs. 257, 258A); região ante-ocular com menos de três vezes o comprimento da pós-ocular, na vista dorsal (fig. 258A); manchas escuras do conexivo dorsal difusas (fig. 257) *ecuadoriensis*
4. Patas nitidamente aneladas (figs. 271, 272F); fêmures anteriores com menos de quatro vezes de comprimento em relação à largura (fig. 272B); processo do pigóforo bifido (fig. 272D, E) *paraensis*
- Patas não aneladas; fêmures anteriores com mais de quatro vezes de comprimento em relação à largura; processo do pigóforo não bifido 5
5. Pronoto totalmente castanho escuro ou preto, inclusive as carenas (figs. 265, 266); manchas conexivas avermelhadas, muito pequenas e situadas nos ângulos póstero-laterais dos segmentos 3 a 6 ou 7 (figs. 265, 266) *neivai*
- Pronoto pardo-amarelado com partes castanho-escuas ou enegrecidas (figs. 251, 252, 254, 255, 259, 260, 262, 263, 279, 280); conexivo dorsal com mancha retangular escura em cada segmento (figs. 251, 252, 254, 255, 259, 260, 262, 263, 276, 277, 279, 280) 6
6. Cabeça proporcionalmente curta, tão comprida ou levemente maior que o pronoto (relação = 1:0,95-1,0) (figs. 254, 255); processo mediano do pigóforo retangular (fig. 256C) *domesticus*
- Cabeça proporcionalmente longa, de comprimento sensivelmente maior que o pronoto (relação = 1:0,65-0,80); processo mediano do pigóforo alongado, de ponta afilada ou romba (figs. 253D; 261D; 264D; 278D; 281F) 7

Figura 61: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

7. Lobo posterior do pronoto uniformemente preto entre as carenas submedianas, que são claras, e entre estas e os bordos laterais, também claros (figs. 251, 252); antenas com o terceiro segmento maior que o segundo (figs. 252, 253C); olhos distintamente mais largos na vista dorsal que a distância interocular (figs. 251, 252, 253A) *brethesi*
- Lobo posterior do pronoto com a área entre as carenas sub-medianas ocupada por duas faixas escuras separadas por linha clara longitudinal do tegumento (figs. 259, 260, 262, 263, 264A; 276; 277); antenas com o terceiro segmento menor que o segundo; olhos, na maioria das espécies, tão largos ou menos largos do que a distância interocular dorsal 8
8. Angulos ântero-laterais do pronoto salientes, dirigidos para diante (figs. 261A, C; 264A, C); faixas escuras do lobo posterior do pronoto confluentes, principalmente as situadas entre as carenas submedianas e os bordos laterais (figs. 260, 262, 263, 264A) 9
- Angulos ântero-laterais do pronoto arredondados, não muito salientes (figs. 278C; 281B); faixas escuras do lobo posterior do pronoto distintamente separadas (figs. 277, 279, 280) 10
9. Colorido geral castanho-escuro; trocanteres muito claros, contrastando fortemente com os fêmures, escuros; conexivo dorsal e ventral com manchas escuras muito bem delimitadas em cada segmento (figs. 262, 263); abdômen na face ventral com mancha longitudinal mediana amarelada que se prolonga ao metasterno; antena com o terceiro segmento com a parte basal escura e a apical clara (fig. 263); processo mediano do pigóforo estreito na base (fig. 264D) *neglectus*
- Colorido geral castanho-avermelhado claro; trocanteres não contrastando nitidamente com o colorido dos fêmures; conexivo dorsal com manchas escuras apenas esboçadas (figs. 259, 260), especialmente na superfície ventral; abdômen na face ventral sem a área clara mencionada; antena com o terceiro segmento com a parte basal clara e a apical escura (figs. 260, 261A); processo mediano do pigóforo largo na base (fig. 261D) *nasutus*

Figura 62: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

10. Espécie menor, comprimento dos machos 17,5-20 mm, das fêmeas 19,5-21,5 mm; região ante-ocular com pouco mais de três vezes o comprimento da pós-ocular (fig. 278A); distância interocular dorsal maior que a largura dorsal de um olho, na maioria dos espécimes; suporte do falosoma como na fig. 278E (ninfas IV e V com as tibias uniformemente escuras) *prolixus*
- Espécie maior, comprimento dos machos 20-23,5 mm, das fêmeas 23-26 mm; região ante-ocular quatro vezes mais longa que a pós-ocular (fig. 280); distância interocular dorsal menor ou igual a largura de um olho nesse aspecto; suporte do falosoma como na figura 281E (ninfas IV e V com tibias nitidamente claras, em comparação com os fêmures, somente seus ápices escuros) *robustus*

Rhodnius dalessandroi Carcavallo & Barreto não pôde ser incluído nesta chave.

CHAVE PARA AS ESPÉCIES DE *Psammolestes*

1. Tegumento da cabeça e do tórax muito polido e brilhante; cabeça sem constricção antes do pescoço, quando observada de perfil (fig. 284B); cabeça dorsalmente com larga faixa amarelada ocupando inteiramente a região interocular (figs. 282, 283); rostro com terceiro segmento e ápice do segundo provido de pêlos longos (fig. 284B); ângulos ântero-laterais do pronoto muito salientes e projetados até o nível dos ocelos (figs. 282, 283, 284A); genitália do macho com suporte do falosoma grande, constituído de duas estruturas fusionadas (fig. 284C) *arthuri*
- Tegumento da cabeça e tórax fosco; cabeça constricta antes do pescoço, quando observada lateralmente (figs. 287B; 290C); cabeça dorsalmente castanho-amarelada clara e pintada de escuro ou escura e com estreita linha longitudinal dorsal amarela; rostro com terceiro e segundo segmentos inteiramente revestidos de pêlos longos (fig. 290C); ângulos ântero-laterais do pronoto mais curtos, não atingindo adiante o nível dos ocelos (figs. 287A, 290D); genitália do macho com suporte do falosoma menor, composto de

Figura 63: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

- duas estruturas separadas (figs. 23A; 290F) 2
2. Cabeça tão longa ou levemente mais curta que a largura ao nível dos olhos (figs. 285, 286, 287A); região anteocular não mais do que o dobro do comprimento da pós-ocular (fig. 287A); cabeça em declive acentuado atrás dos ocelos (fig. 287B); ângulos ântero-laterais do pronoto acuminados (figs. 286, 287A); genitália do macho com suporte do falosoma muito pequeno e em forma de ganchos, a esclerosação dorsal do falosoma em forma semi-elítica (fig. 23A) . *coreodes*
 Cabeça de comprimento levemente maior que a largura ao nível dos olhos (fig. 290D); região anteocular com duas a duas e meia vezes o comprimento da pós-ocular (fig. 290D); cabeça em declive moderado atrás dos ocelos (fig. 290C); ângulos ântero-laterais do pronoto muito curtos, rombos (fig. 290D); genitália do macho com suporte do falosoma em forma de dois SS alargados e esclerosação dorsal do falosoma arredondada apicalmente (fig. 290E) *sertius*

CHAVE PARA AS ESPECIES DE *Parabellminus*

1. Cabeça espessada (figs. 309, 310, 311F); largura do olho menor do que a metade da distância interocular dorsal; pronoto com os lados quase constituindo uma linha contínua (figs. 309, 310); ângulos ântero-laterais pontudos (fig. 310) *carioca*
 Cabeça delgada (figs. 312, 313A); largura do olho com pouco mais da metade da distância interocular dorsal; pronoto com os lados formando ângulos conspícuos (figs. 312, 313A); ângulos ântero-laterais arredondados (figs. 312, 313A) *yurupucu*

CHAVE PARA AS ESPÉCIES DE *Microtriatoma*

1. Hemélitros com membrana manchada de claro e escuro (fig. 316A, B); cabeça delgada, de perfil (fig. 318B, I, N-R, W, X); cabeça com a região pós-ocular no máximo uma vez e meia (1.6:1) mais larga que longa (fig. 318A, D-H, J-M); terceiro segmento do rostro muito mais curto que o primeiro (0.7-0.8:1) (fig. 318I, P, K) *trinidadensis*

Figura 64: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
 (Lent & Wygodzinsky 1979*).

Hemélitros com membrana uniformemente escura (fig. 314); cabeça espessada, de perfil (fig. 315A); cabeça com a região pós-ocular mais que uma vez e meia tão larga quanto longa (1.8:1) (fig. 315C); terceiro segmento do rostro tão longo quanto o primeiro (fig. 315A) *borbai*

Figura 65: Chave para as Tribos, Gêneros e Espécies de Triatominae.
(Lent & Wygodzinsky 1979*).

* Lent H & Wygodzinsky P 1979. *Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' Disease*. Bull Am Mus Nat His 163: 125-520.

8. RELAÇÃO DAS ESPÉCIES DE TRIATOMÍNEOS DESCritAS OU REVALIDADAS

Tendo como base Jurberg & Galvão (1997), Galvão *et al.* (2003), Schofield & Galvão (2009), Jurberg *et al.* (2010), Campos *et al.* (2011) e Caranhas *et al.* (2011).

Tribo Alberprozeniini

***Alberprozenia malheiroi* Serra, Atzingen & Serra, 1980**

SERRA, R.G.; ATZINGEN, N.C.B.; SERRA, O.P. Nova espécie do gênero *Alberprosenia* Martinez & Carcavallo, 1977, do Estado do Pará, Brasil. Anais do V Congresso Brasileiro de Parasitologia, Rio de Janeiro, p. 126, 1980.

Tribo Bolboderini

***Belminus pittieri* Osuna & Ayala, 1993**

OSUNA, E.; AYALA, J.M. *Belminus pittieri*, nueva especie de Bolboderini (Triatominae: Reduviidae: Heteroptera). *Boletín de Entomología Venezolana*, v. 8, p. 147–50, 1993.

***Belminus laportei* Lent, Jurberg & Carcavallo, 1995**

LENT, H.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R.U. *Belminus laportei* sp. n. da região Amazônica (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 90, p. 33-9, 1995.

***Belminus corredori* Galvão & Angulo, 2006**

GALVÃO, C.; ANGULO, V.M. *Belminus corredori*, a new species of Bolboderini (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae) from Santander (Colombia). *Zootaxa*, v. 1241, p. 61–8, 2006.

Belminus ferroae Sandoval, Pabón, Jurberg & Galvão, 2007

SANDOVAL, C.M.; PABÓN, E.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. *Belminus ferroae* n. sp. from the Colombia north-east, with a key to the species of the genus (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, v. 1443, p. 55-64, 2007.

Tribo Cavernicolini

Cavernicola lenti Barrett & Arias, 1985

BARRETT, T.V.; ARIAS, J.R. A new triatomine host of *Trypanosoma cruzi* from the Central Amazon of Brasil: *Cavernicola lenti* n. sp. (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 91-6, 1985.

Tribo Rhodniini

Rhodnius amazonicus Almeida, Santos & Sposina, 1973

ALMEIDA, F.B.; SANTOS, E.I.; SPOSINA, G. Triatomíneos da Amazônia III. *Acta Amazônica* 3, 43-66, 1973.

Rhodnius stali Lent, Jurberg & Galvão, 1993

LENT, H.; JURBERG, J.; GALVÃO, C. *Rhodnius stali* n. sp., afim de *Rhodnius pictipes* Stål, 1872. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 88, p. 605-14, 1993.

Rhodnius colombiensis Mejia, Galvão & Jurberg, 1999

MEJIA, J.M.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. *Rhodnius colombiensis* sp. n. da Colômbia, com quadros comparativos entre estruturas fálicas do gênero *Rhodnius* Stål, 1859 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores*, v. 6, 601-17, 1999.

Rhodnius milesi Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg, 2001 in Valente *et al.* (2001)

VALENTE, V.C.; VALENTE, S.A.S.; CARCAVALLO, R.U.; ROCHA, D.S.; GALVÃO, C.; JURBERG, J. Considerações sobre uma nova espécie do gênero *Rhodnius* Stål, do estado do Pará, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomologia y Vectores*, v. 8, p. 65-80, 2001.

Rhodnius zeledoni Jurberg, Rocha & Galvão, 2009

JURBERG, J.; ROCHA, D.S.; GALVÃO, C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Biota Neotropica*, v. 9, p. 123-8, 2009.

Tribo Triatomini

Triatoma garciabesi Carcavallo, Cichero, Martínez, Prosen & Ronderos, 1967. (Revalidada)

CARCAVALLO, R.U.; CICHERO, J.A.; MARTÍNEZ, A.; PROSEN, A.F.; RONDEROS, R. Una nueva especie del género *Triatoma* Laporte (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Segundas Jornadas Entomo-epidemiológicas Argentinas*, v. 2, p. 43-8, 1967.

Triatoma brailovskyi Martínez, Carcavallo & Peláez, 1984

MARTÍNEZ, A.; CARCAVALLO, R.U.; PELAEZ, D. *Triatoma brailovskyi*, nueva especie Triatominae de México. *Chagas*, v. 1, p. 39-42, 1984.

Triatoma bolivari Carcavallo, Martínez & Peláez, 1987

CARCAVALLO, R.U.; MARTÍNEZ, A.; PELAEZ, D. Una nueva especie de *Triatoma* Laporte de México. *Chagas*, v. 4, p. 4-5, 1987.

Triatoma gomeznunezi Martínez, Carcavallo & Jurberg, 1994

MARTÍNEZ, A.; CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J. *Triatoma gomeznunezi* a new species of Triatomini from México (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores*, v. 1, 15–9, 1994.

Triatoma carcavalloi Jurberg, Rocha & Lent, 1998

JURBERG, J.; ROCHA, D.S.; LOROSA, E.S.; VINHAES, M.; LENT, H. Uma nova espécie de *Triatoma* do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae). *Entomología y Vectores*, v. 5, p. 295-310, 1998.

Triatoma jurbergi Carcavallo, Galvão & Lent, 1998

CARCAVALLO, R.U.; GALVÃO, C. & LENT, H. *Triatoma jurbergi* sp. n. do norte do estado do Mato Grosso, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) com uma atualização das sinonímias e outros táxons. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 459–64, 1998.

Triatoma baratai Carcavallo & Jurberg, 2000

CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J. *Triatoma baratai* sp. n. do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores*, v. 7, 373–87, 2000.

Triatoma klugi Carcavallo, Jurberg, Lent, Galvão, Steindel & Carvalho Pinto, 2001.

CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H.; GALVÃO, C.; STEINDEL, M.; CARVALHO PINTO, C.J. Nova especie do complexo oliveirai (nova denominação para o complexo matogrossensis) (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) do estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 71-9, 2001.

Triatoma sherlocki Papa, Jurberg, Carcavallo, Cerqueira & Barata, 2002

PAPA, A.R.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R.U.; CERQUEIRA, R.L.; BARATA, J.M.S. *Triatoma sherlocki* sp. n. coletada na Bahia, Brasil (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Entomología y Vectores*, v. 9, p. 133–46, 2002.

Triatoma vandae Carcavallo, Jurberg, Rocha, Galvão, Noireau & Lent, 2002

CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; ROCHA, D.S.; GALVÃO, C.; NOIREAU, F.; LENT, H. *Triatoma vandae* sp. n. do complexo oliveirai encontrada no Estado de Mato Grosso, Brasil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 649–54, 2002.

Triatoma melanica Costa, Argolo & Felix, 2006

COSTA, J.; ARGOLO, A.M.; FELIX, M. Redescription of *Triatoma melanica* Neiva and Lent, 1941 new status (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Zootaxa*, v. 1385, p. 47–52, 2006.

Triatoma juazeirensis Costa & Felix, 2007.

COSTA, J.; FELIX, M. *Triatoma juazeirensis* sp. nov. from the state of Bahia Northeastern Brazil (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 87–90, 2007.

Triatoma boliviensis Martinez, Chavez, Sossa, Aranda, Vargas & Vidaurre, 2007

MARTINEZ, E.; CHAVEZ, T.; SOSSA, D.; ARANDA, R.; VARGAS, B.; VIDAURRE, P. *Triatoma boliviensis* sp.n. de los valles subandinos de La Paz, Bolivia (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae), similar a *Triatoma nigromaculata* Stål 1859. *Boletín del Instituto de Investigación en Salud y Desarrollo*, v. 3, p.1–11, 2007.

Panstrongylus mitarakaensis Bérenger & Blanchet, 2007

BÉRENGER, J.M.; BLANCHET, D. A new species of the genus *Panstrongylus* from French Guiana (Heteroptera; Reduviidae; Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 733–6, 2007.

Linchcosteus karupus Galvão, Patterson Rocha & Jurberg, 2002

Galvão, C.; Patterson, J.S.; Rocha, D.S.; Jurberg, J.; Carcavallo, R.U.; Rajen, K.; Ambrose, D.P.; Miles, M.A. A new species of triatomine from Tamil Nabal, India. *Medical of Veterinary Entomology*, v. 16, p. 75–82, 2002.

Hermanlentia matsunoi (Fernández-Loayza, 1989)

JURBERG, J.; GALVÃO, C. *Hermanlentia* n.gen. da tribo Triatomini, com um rol de espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 181- 5, 1997.

****Meccus bassolsae*** (Aguilar, Torres, Jiménez, Jurberg, Galvão & Carcavallo, 1999)

AGUILAR, R.A., TORRES, B.N., JIMENEZ, M.C., JURBERG, J., GALVÃO, C. & CARCAVALLO, R. *Triatoma bassolsae* sp.n. do México, com uma chave para as espécies do complexo "phyllosoma" (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 353-9, 1999.

****Nesotriatoma bruneri*** Usinger, 1944

USINGER, R.L. The Triatominae of North and Central América and the West Indies and their public health significance. *US Public Health Bulletin*, v. 288, p. 1-83.

****Mepraia spinolai*** (Porter, 1934)

PORTER, C.E. Una *Triatoma* nueva chilena. *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 37, p. 192-3, 1934.

****Mepraia gajardoi* Frias, Henry & Gonzalez, 1998**

FRIAS, D.A.; HENRY, A.A.; GONZALEZ, C.R. *Mepraia gajardoi*: a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. *Revista Chilena de Historia Natural*, v.71, p.177-88, 1998.

* Schofield & Galvão (2009) baseados em estudos genéticos não consideram os gêneros *Meccus* e *Nesotriatoma*, e excluem *Mepraia* até que novos estudos possam confirmar o seu status. Desta forma, sugerem que as espécies destes gêneros pertençam ao grupo ou complexo de espécies de *Triatoma*. Assim, em 2009, Jurberg et al., foram validados 15 gêneros e 141 espécies. Em 2011, Campos et al., com base em estudos de morfometria geométrica das asas, continuam reconhecendo o gênero *Mepraia* composto por duas espécies: *M. spinolai* e *M. gajardoi*. Entretanto, recentemente, Caranhas et al. (2011) mantendo o número de 141 espécies citam a existência de 18 gêneros, sugerindo desta forma, a reconsideração dos três gêneros (*Meccus*, *Nesotriatoma* e *Mepraia*) excluídos da proposta de Schofield & Galvão (2009).

BIBLIOGRAFIA

CAMPOS, R.; BOTTO-MAHAN, C.; CORONADO XIMENA; JARAMILLO, N.; PANZERA, F.; SOLARI, A. Wing shape differentiation of *Mepraia* species (Hemiptera: Reduviidae). *Infection, Genetics and Evolution*, v. 11, p. 329–33, 2011.

CARANHAS, L.; GURGEL-GONÇALVES, R.; RAMALHO, R.D.; GALVÃO, C. New records and geographic distribution map of *Triatoma petrocchiae* Pinto and Barreto, 1925 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Check List*, v. 4, p. 508-9, 2011.

GALVÃO C.; CARCAVALLO R.; ROCHA D.S.; JURBERG, J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic. *Zootaxa*, v. 202, p. 1-36, 2003.

JURBERG, J.; GALVÃO, C. Hermanlentia n.gen. da tribo Triatomini, com um rol de espécies de Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p.181-5, 1997.

JURBERG, J.; ROCHA, D.S.; GALVÃO, C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Biota Neotropica*, v. 9, p. 123-8, 2009.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera: Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin American Museum Natural History*, v. 163, p. 125-520, 1979.

SCHOFIELD, C.J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, v. 110, p. 88-100, 2009.

9. MORFOLOGIA EXTERNA DO TRIATOMÍNEO

9.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS EXTERNOS E NOMENCLATURA DAS ESTRUTURAS

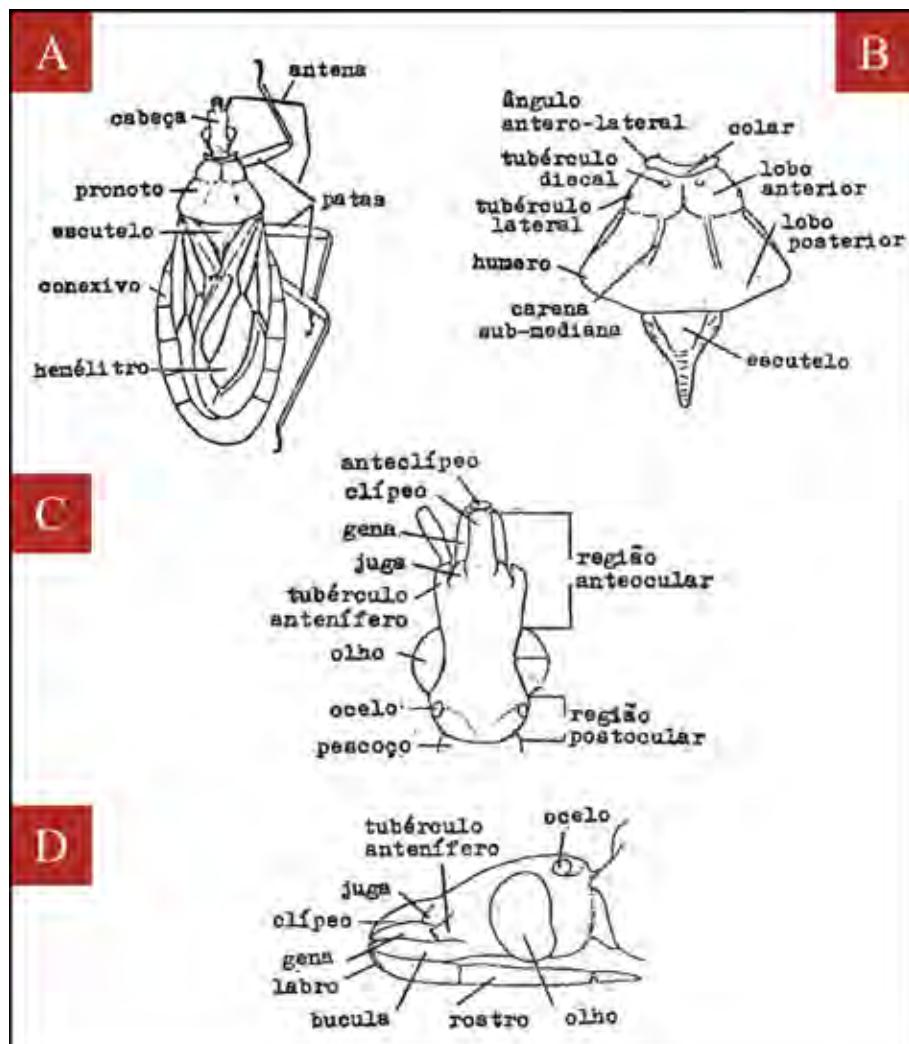


Figura 66: Morfologia externa, vista dorsal do triatomíneo: A) Aspecto geral; B) Tórax, vista dorsal; C) Cabeça, vista dorsal; D) Cabeça, vista lateral
(*Lent & Wygodzinsky 1979).

Adaptado por Teresa Cristina M. Gonçalves.

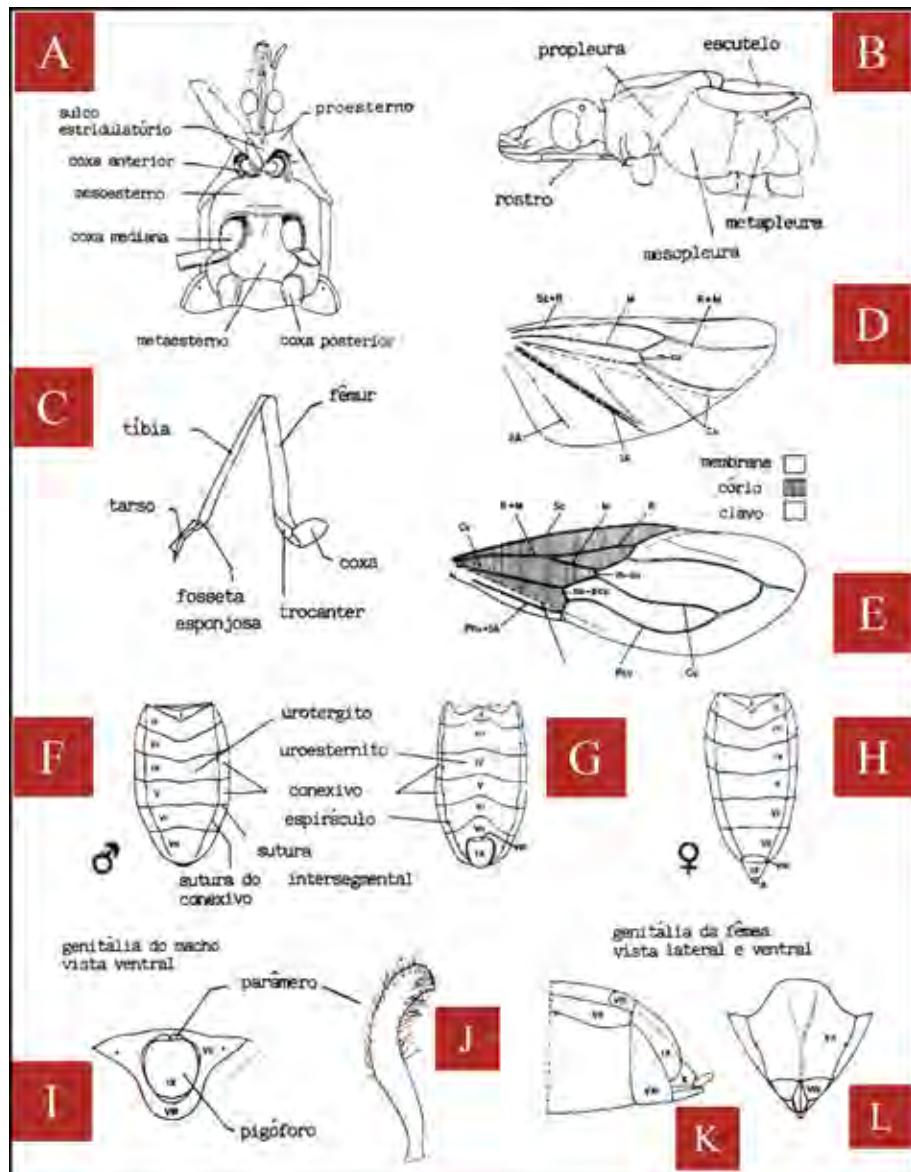


Figura 67: Morfologia externa (vista ventral e lateral): A) tórax, vista ventral; B) tórax, vista lateral; C) patas; D) asa anterior ou hemélitro; E) asa posterior; F) abdômen do macho, vista dorsal; G) idem, vista ventral; H) abdômen da fêmea, vista dorsal; I) último segmento abdominal ventral do macho com genitália; J) parâmero; K) abdômen da fêmea, vista lateral; L) últimos segmentos abdominais ventrais da fêmea (*Lent & Wygodzinsky 1979).

Adaptado por Teresa Cristina M. Gonçalves..

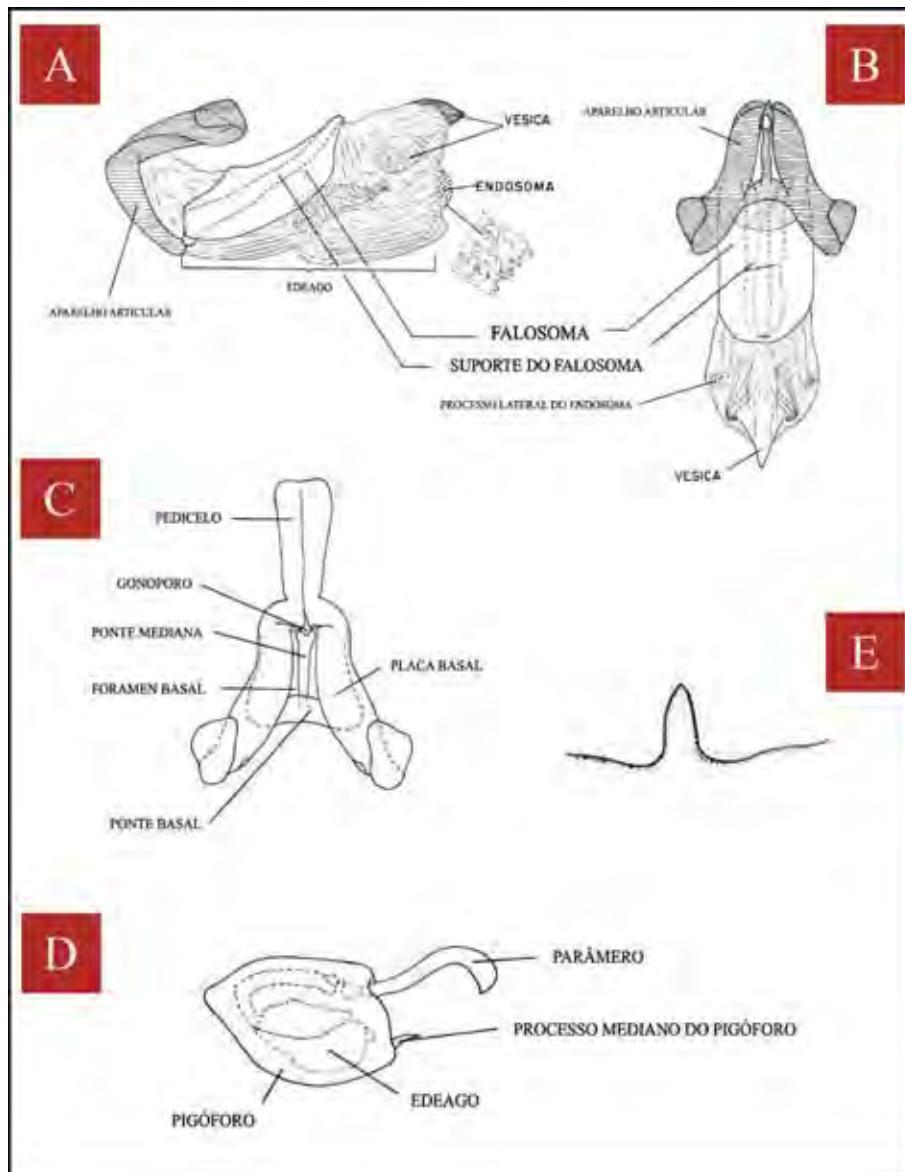


Figura 68: *Triatoma rubrofasciata*, genitália do macho: (A) falo, semi-evertido, vista lateral; B) idem, vista dorsal; C) aparelho articular; D) pigóforo, vista lateral; E) processo mediano do pigóforo, vista dorsal (*Lent & Wygodzinsky 1979).

Adaptado por Teresa Cristina M. Gonçalves.



Figura 69: Hemípteros e os diferentes tipos de aparelhos bucais (vista ventral): A) fitófago; B) predador; C) hematófago.

Fotos: Catarina Macedo.

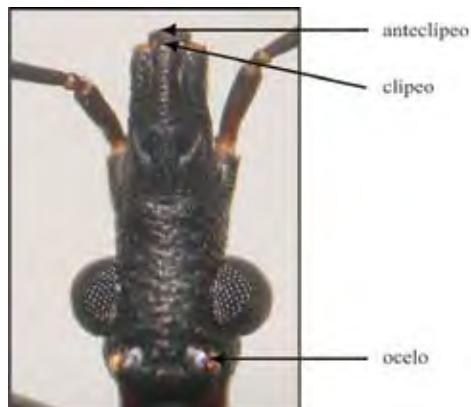


Figura 70: Distinção do limite do clípeo e do anteclípeo; ocelo elevado situado em nítida saliência.

Foto: Catarina Macedo.

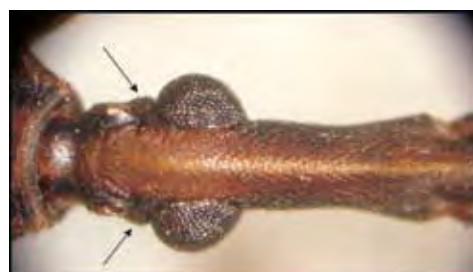


Figura 71: Calosidade pós-ocular presente em todas as espécies da Tribo *Rhodniini*.

Fotos: Catarina Macedo.



A



B



C

Figura 72: Aspectos do pronoto:
A) *P. megistus*;
B) *T. sordida*;
C) *R. brethesi*.

Foto: Catarina Macedo.

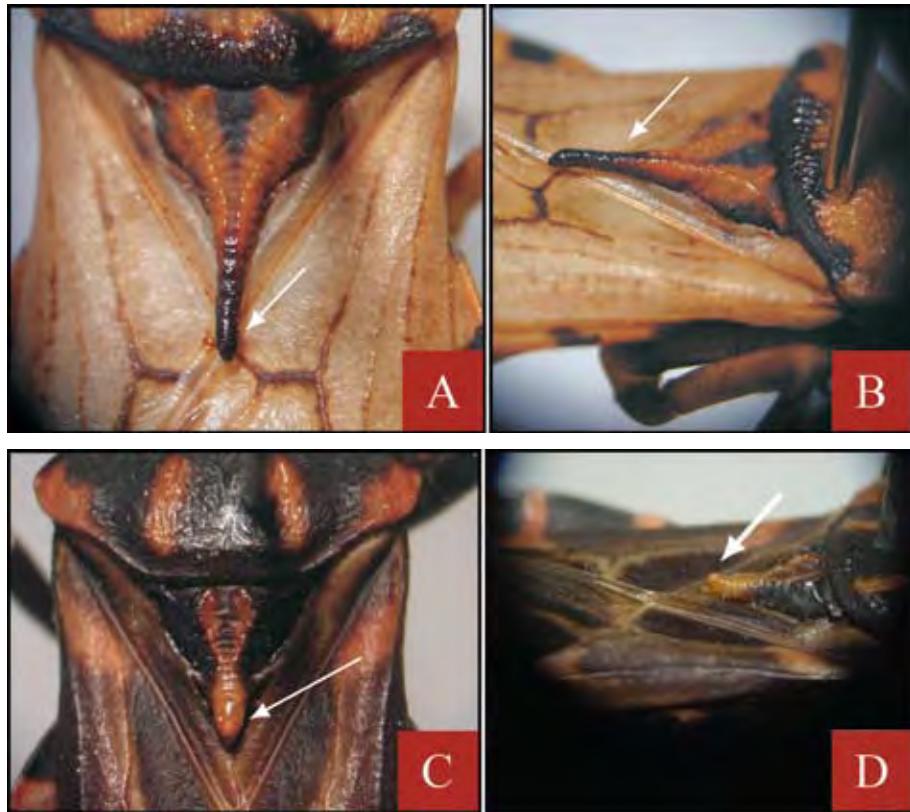


Figura 73: Processo apical do escutelo alongado, sub-cilíndrico, afilando para a ponta: A) vista dorsal; B) vista lateral. Processo apical do escutelo arredondado, cônico ou truncado na ponta: C) vista dorsal; D) vista lateral.

Fotos: Catarina Macedo.

9.2 ILUSTRAÇÕES DAS CHAVES DICOTÔMICAS

A seguir estão ilustradas as principais estruturas morfológicas empregadas na identificação das diferentes espécies de triatomíneos. Essas ilustrações estão no livro de Lent & Wygodzinsky, 1979, e foram adaptadas por Teresa Cristina M. Gonçalves.

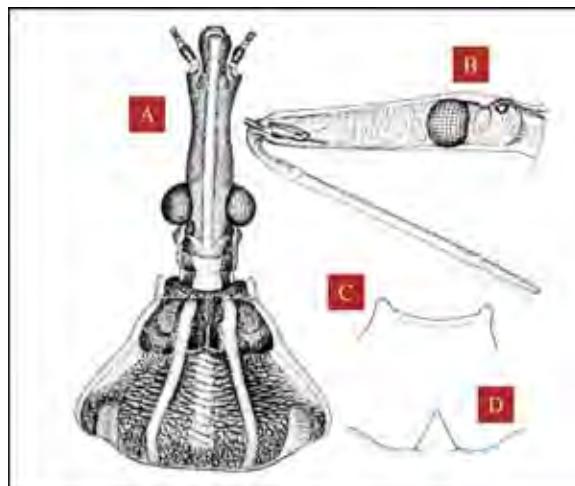


Figura 74 (correspondente a Fig. 264 na chave dicotômica):
Rhodnius neglectus: A) cabeça e pronoto; B) cabeça, vista lateral;
C) colar; D) processo mediano do pigóforo.

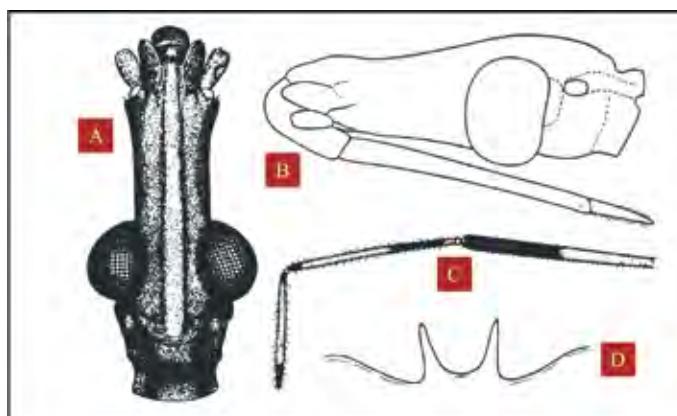


Figura 75 (correspondente a Fig. 275 na chave dicotômica):
Rhodnius pictipes: A) cabeça, vista dorsal; B) cabeça, vista lateral;
C) antena com padrão de pigmentos, primeiro segmento ausente;
D) processo mediano do pigóforo.

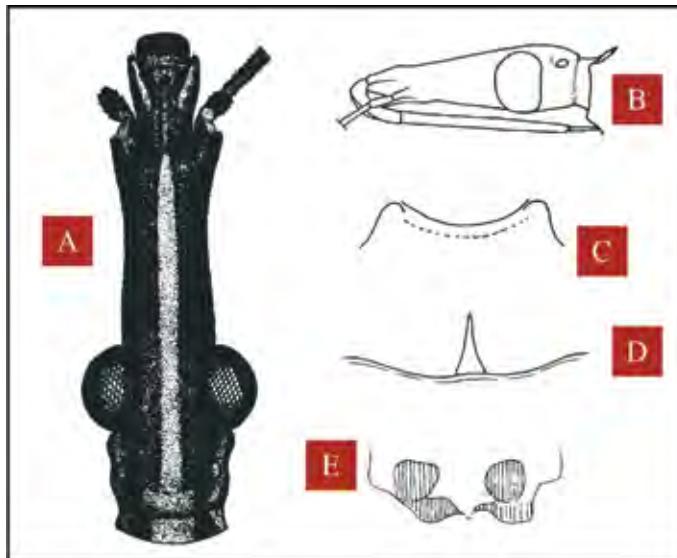


Figura 76 (correspondente a Fig. 278 na chave dicotômica):
Rhodnius prolixus: A) cabeça, vista dorsal; B) cabeça, vista lateral; C) collar;
 D) processo mediano do pigóforo; E) suporte do fálosoma.

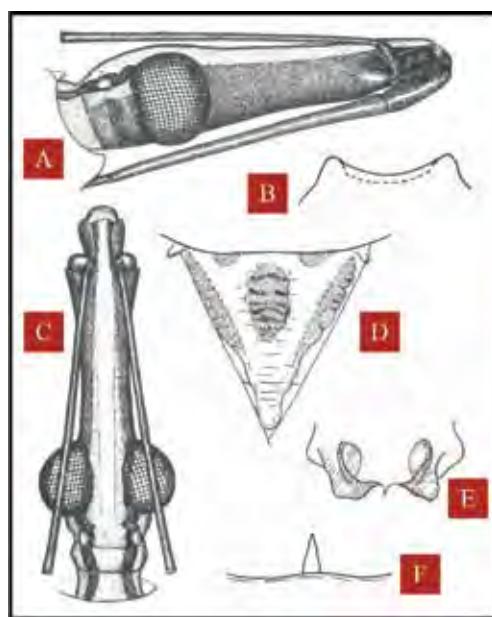


Figura 77 (correspondente a Fig. 281 na chave dicotômica):
Rhodnius robustus: A) cabeça, vista lateral; B) collar; C) cabeça, vista dorsal;
 D) escutelo; E) suporte do fálosoma; F) processo mediano do pigóforo.

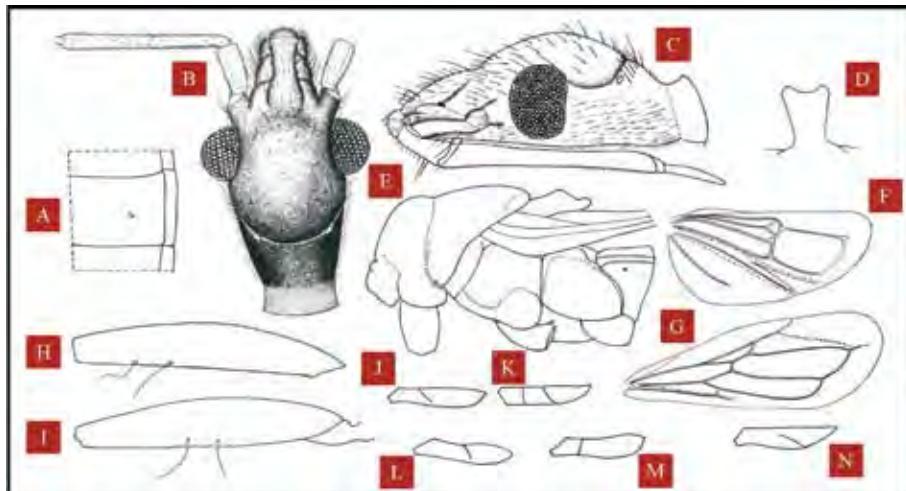


Figura 78 (correspondente a Fig. 293 na chave dicotômica):
Cavernicola pilosa: A) porção lateral da área ventral; B) cabeça, vista dorsal; C) cabeça, vista lateral; D) processo mediano do pigóforo; E) tórax, vista lateral; F) venação da asa posterior; G) venação do hemélitro; H,I) fêmur posterior, com tricobótria; J-N) interior da célula da membrana, com nervura transversal hipotética.

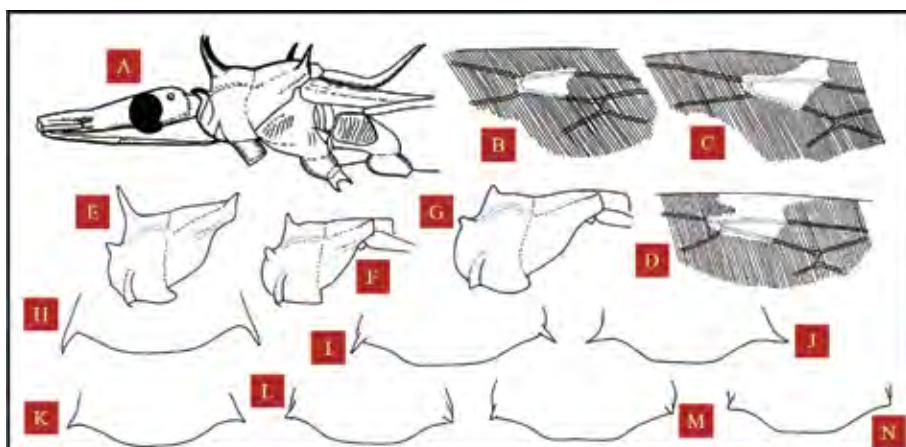


Figura 79 (correspondente a Fig. 198 na chave dicotômica):
Eratyrus mucronatus: A) cabeça e tórax, vista lateral, espécime da Guiana; B-D) porção da região anterior do hemélitro; B) espécime de Urcupata, Peru; C) Manaus, Amazonas, Brasil; D) San Juan de Lagunillas, Mérida, Venezuela; E-G) pronoto, vista lateral; E) San Juan de Lagunillas, Mérida, Venezuela; F) Aragua, Lara, Venezuela; G) Borbur, Boyacá, Colômbia; H-N) pronoto, bordo posterior, ângulo humeral; H) Urcupata, Peru; I) Vila Vera, Mato Grosso, Brasil; J) Trinidad; K) Hacienda Bonaire, Lara, Venezuela; L) Aragua, Lara, Venezuela; M) Ejido, Mérida, Venezuela; N) Colônia de laboratório, Venezuela.

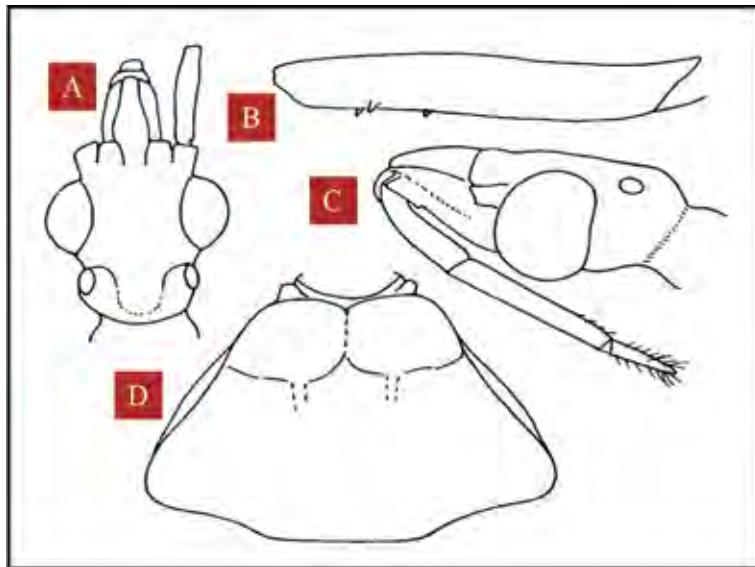


Figura 80 (correspondente a Fig. 218 na chave dicotômica):
Panstrongylus diasii: A) cabeça, vista dorsal; B) fêmur anterior;
 C) cabeça, vista lateral; D) pronoto.

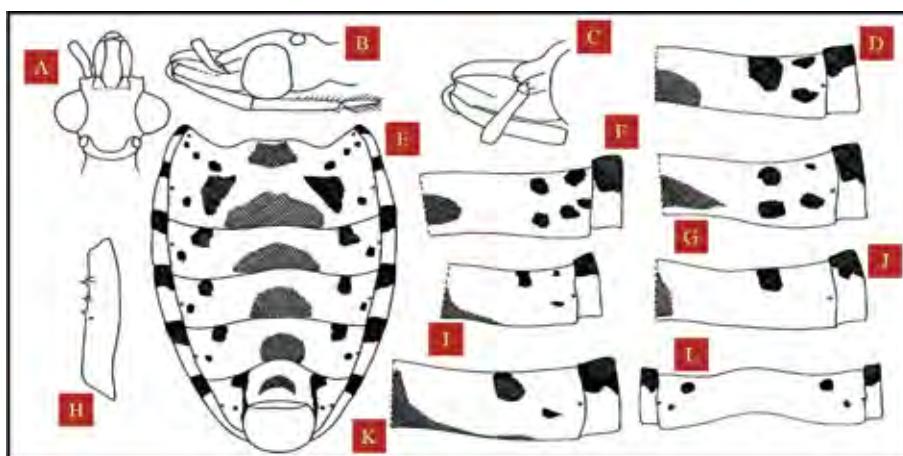


Figura 81 (correspondente a Fig. 221 na chave dicotômica):
Panstrongylus geniculatus: A) cabeça, vista dorsal; B) cabeça, vista lateral; C) região anteocular da cabeça; D) padrão cromático do conexivo ventral, com metade lateral do urosternito, espécime de Barro Colorado, Panamá; E) padrão cromático de espécime de Barro Colorado; F) padrão pigmentar do conexivo ventral, com metade lateral do urosternito, espécime de Trinidad; G) idem, espécime diferente de Trinidad; H) fêmur anterior; I-L) padrão do conexivo ventral, com metade lateral do urosternito: I) espécime de Satipo, Peru; J) Chavantina, Mato Grosso, Brasil; K) Rio Marañon, Peru; L) Venezuela.

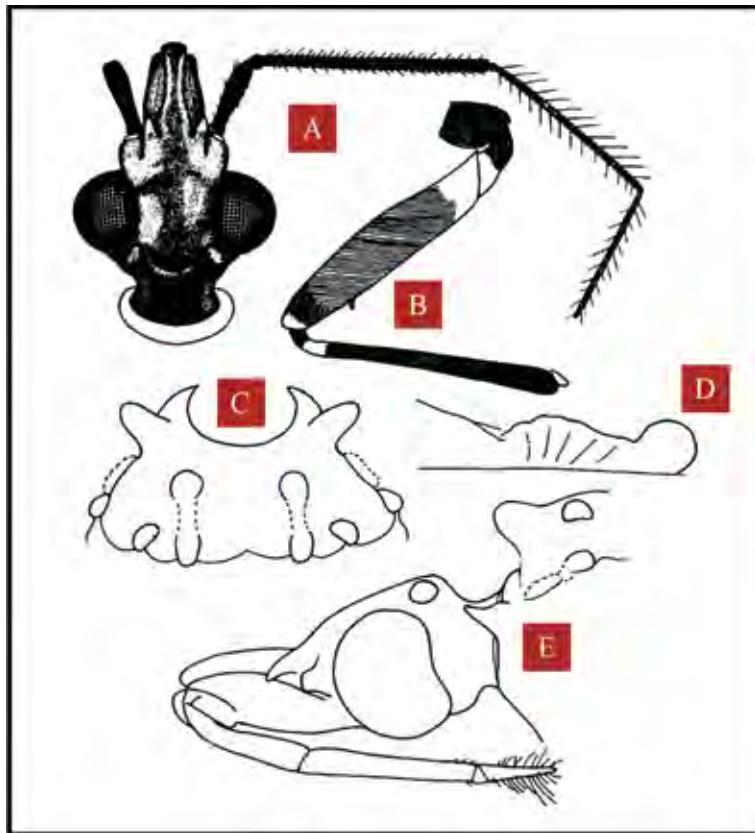


Figura 82 (correspondente a Fig. 236 na chave dicotômica):
Panstrongylus lignarius: A) cabeça, vista dorsal; B) padrão cromático da pata anterior; C) pronoto esquemático; D) processo apical do escutelo;
E) cabeça e porção anterior do protórax, vista lateral.

10. TÉCNICAS

10.1 CAPTURA DE TRIATOMÍNEOS

As técnicas de captura de triatomíneos podem ser realizadas através de dois métodos: busca passiva e busca ativa.

10.1.1 BUSCA ATIVA

Esse método consiste na busca homem a homem que pode ser realizada no domicílio, no peridomicílio e no ambiente silvestre. Marcas de fezes nas paredes exuvias e ovos eclodidos são sinais importantes que indicam a presença de triatomíneos no local de coleta (Figura 83).

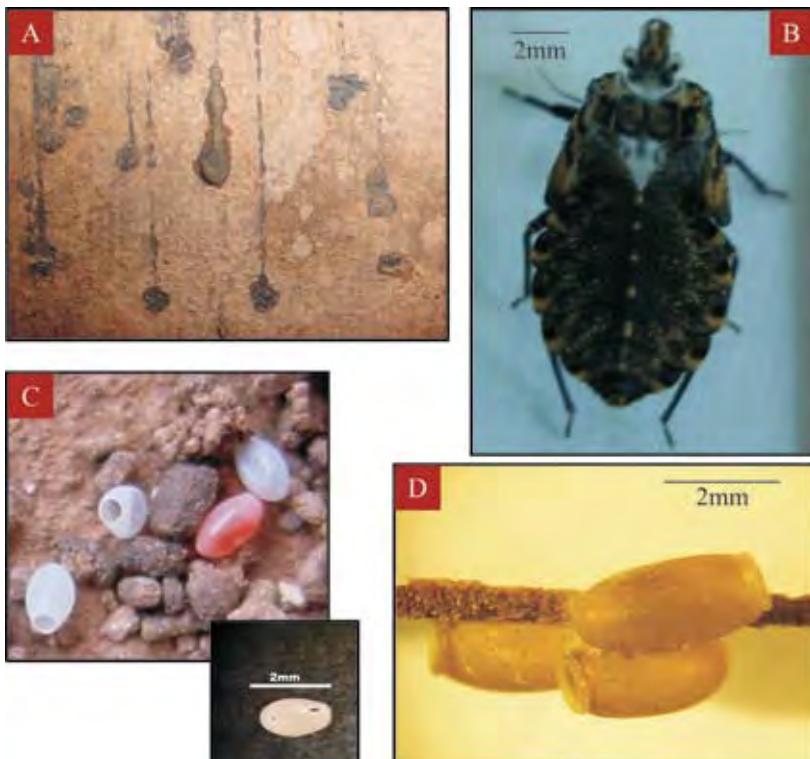


Figura 83: Vestígios da presença de triatomíneos: A) marcas de fezes na parede; B) exúvia de 5º estádio; C) ovos e casca de ovos; D) casca de ovos aderidos à palha da piaçaba.

Fotos: Anthony Guimarães (A), Teresa Cristina M. Gonçalves (B e D), Catarina Macedo (C).

A) DOMICÍLIO

No domicílio a pesquisa é feita em estrados de cama, objetos guardados, caixas, paredes, calendários e fotos presas em paredes, roupas e teto com folhas de palmeira (Figura 84).



Figura 84: Pesquisa no domicílio: A) sob colchão; B) atrás de calendários, quadros e objetos pendurados na parede.

Fotos: Catarina Macedo.

B) PERIDOMICÍLIO

No peridomicílio, a investigação é mais abrangente, por ser uma área onde existem muitos locais que podem servir de abrigo para os triatomíneos. Sendo assim, é um trabalho mais demorado que requer muita atenção. Geralmente no peridomicílio, existem amontoados de telhas, lenhas e tijolos, cerca de curral, galinheiros e pocilgas, paióis, fornos, etc (Figura 85). As lenhas e cercas normalmente têm suas cascas soltas e é sob elas que os triatomíneos ficam escondidos. Sendo assim, as cascas devem ser removidas com cuidado para a observação da presença de todas as formas do desenvolvimento dos triatomíneos, isto é, de sua evolução de ovo à fase adulta.



Figura 85: Locais de investigação no peridomicílio: A) amontoado de tijolos; B) galinheiro; C) amontoado de telhas; D) amontoado de lenha.

Fotos: Teresa Cristina M. Gonçalves (A,B e C) e Catarina Macedo (D).

C) SILVESTRE

No ambiente silvestre as buscas são realizadas em locais que podem abrigar os possíveis hospedeiros. Esses ambientes incluem pedras, ninhos de aves, sob a casca de troncos de árvores ou arbustos, troncos de árvore, tocas de animais, bromélias, palmeiras e outros que variam de acordo com a região que está sendo trabalhada.

Para as buscas em área de pedras, essas devem ser levantadas e, após a observação, devem retornar para a mesma posição, de modo a não alterar o ambiente (Figura 86A).

No caso das palmeiras, é possível trabalhar com o uso de armadilha com isca animal ou com a derrubada da palmeira. Nesse caso, é preciso de uma autorização para a sua derrubada. O trabalho é realizado através da retirada das folhas uma a uma até chegar à parte central (Figura 86B).



Figura 86: Investigação no ambiente silvestre: A) sob pedras; B) palmeira.

Fotos: Catarina Macedo (A) e Angéla C. V. Junqueira (B).

No caso dos ninhos (Figura 87) e cascas de árvores (Figura 88), esses devem ser removidos com cuidado e colocados sobre um pano branco para que se proceda a dissecção em busca do triatomíneo.

Na região amazônica, é encontrada uma diversidade de palmeiras, habitat onde observa-se com frequência, espécies do gênero *Rhodnius*, (Ricardo - Silva, 2010).



Figura 87: Investigação de ninhos de aves no ambiente silvestre (A, B).

Fotos: Catarina Macedo.



Figura 88: A) investigação em bromélia; B) investigação sob casca de árvore.

Fotos: Catarina Macedo (A) e Anthony Guimarães (B).

Na palmeira *Leopoldina piassaba*, de onde se retira a piassaba, são encontrados com frequência, espécimes de *Rhodnius brethesi*. Esses têm demonstrado um comportamento agressivo para com os colhedores da piassaba que vivem, durante alguns meses, nos piaçabais para o trabalho de extrativismo da fibra da palmeira.

O transporte e o armazenamento desse material devem ser feitos com cuidado para evitar a dispersão dessa espécie através do transporte passivo (Figura 89).



Figura 89: A) *Leopoldina piassaba*; B) detalhe da palha da piaçaba; C) piaçaba após descarregamento; D) preparo do material; E) piaçaba pronta para o transporte.

Fotos: Teresa Cristina M. Gonçalves.

O trabalho de dissecção das palmeiras é feito a partir da retirada das folhas mais externas até chegar ao centro da palmeira, região denominada olho.

Todas as espécies da tribo *Rhodniini* e algumas do gênero *Triatoma* depositam seus ovos colados ao substrato. Esse comportamento possibilita que os ovos sejam transportados de um lugar para outro, através da dispersão passiva. As espécies da tribo *Rhodniini* são, em sua maioria, parasitas de aves e essas podem levar os ovos presos em suas penas (Figura 90A). Da mesma forma, as palmeiras são habitats comuns às espécies do gênero *Rhodnius*, que podem fixar os seus ovos nas folhas e/ou no fruto (Figura 90B-C). Aliás, este foi o motivo que levou à domiciliação de *Rhodnius prolixus* em alguns países da América Latina: o homem ter usado a palha da palmeira para cobrir suas casas.



Figura 90: A) ovo fixado na pena de ave; B) inflorescência do babaçu; C) ovo fixado na inflorescência.

Fotos: Catarina Macedo.

D) MATERIAL UTILIZADO NA BUSCA ATIVA:

- pinça entomológica;
- lanterna e pilhas;
- frascos com papel sanfonado para armazenar os insetos coletados;
- caneta pilot para escrever nos potes;
- GPS para o georeferenciamento;
- luvas.

10.1.2 BUSCA PASSIVA

Nesse método, a captura é feita com armadilhas que atraem os insetos, portanto não há uma participação direta do homem. Essas armadilhas podem ser de dois tipos: armadilha luminosa e armadilha com isca animal.

A armadilha luminosa do tipo Malaise é formada por um tecido branco que mede cerca de 1,5m x 1,5m e por uma fonte luminosa, a qual será responsável pela atração dos insetos (Figura 91). O tecido deve ser amarrado nas quatro extremidades de modo que fique esticado e a luz possa refletir na sua superfície. Essa armadilha é montada no período noturno, durante aproximadamente quatro horas, para que haja o efeito da luz sobre os insetos. Durante a exposição, é necessária a permanência do homem em local próximo à armadilha, para que, caso um triatomíneo seja atraído, o mesmo possa ser coletado.

Existe outro tipo de armadilha luminosa, com base no uso de lâmpada, que fica disposta a certa altura do solo, de modo que o raio de luz tenha um maior alcance. Essa armadilha fica acesa durante todo o período noturno e pela manhã é feita a pesquisa do material que foi coletado. A referida lâmpada pode ser ligada em luz elétrica ou em um gerador (Figura 92).



Figura 91: Captura noturna com armadilha luminosa do tipo Malaise.

Foto: Teresa Cristina M. Gonçalves.



Figura 92: Armadilha luminosa utilizada na captura noturna.

Foto: Teresa Cristina M. Gonçalves.

A armadilha com isca animal ou armadilha de Noireau, comumente utilizada para as capturas no ambiente silvestre, baseia-se na utilização de um pote plástico, cuja tampa deve ser telada, na parte central. Na parte superior, é envolta por uma fita adesiva de dupla face. No interior, é colocado um animal (pinto ou camundongo) para que sirva de isca para o triatomíneo (Figuras 93 e 94).

Ao redor do bordo inferior, é colocada uma fita adesiva para que seja anotada a numeração da armadilha, a qual é seguida até o final do estudo. Esse tipo de armadilha é usado em copa de palmeiras, buracos de pedra, toca de animais, ocos de árvores, etc. (Figura 95) e dispensa a presença do homem. O período de permanência das armadilhas no local pode variar de acordo com as condições do trabalho.

10.2 TRANSPORTE DOS INSETOS COLETADOS

Os insetos coletados deverão ser acondicionados em recipientes, devidamente identificados quanto ao local de captura, nome do coletor e data (Figura 96). Estes dados são de extrema importância porque, havendo a necessidade de retornar ao local de coleta para capturar mais espécimes, as referidas informações possibilitarão a repetição do procedimento.

O recipiente para o transporte do inseto vivo deverá conter em seu interior papel dobrado em sanfona, para aumentar a superfície de contato. Pequenos orifícios devem ser feitos na tampa, entretanto, com o cuidado de não serem muito grandes para que os ovos e ninfas de 1º estádio não passem (Figura 97).

No caso de insetos mortos, os mesmos devem ser contidos no recipiente com um papel fino (papel higiênico ou lenço de papel), para evitar que se desloquem dentro do recipiente, deslocamento esse que poderia danificar as estruturas delicadas, como antenas, tarsos e cerdas, dificultando sua identificação (Figura 98). Os potes para transporte devem ser de plástico com aproximadamente 5 mm de diâmetro e 4 mm de altura, medidas adotadas pelas Secretarias de Saúde.



Figura 93: Sequência da montagem da armadilha de Noireau:
A) material utilizado; B) colocação da isca animal no interior do pote;
C) fechamento do pote, evidenciando a tampa telada e a
colocação da fita dupla face; D) armadilha montada.

Fotos: Anthony Guimarães.

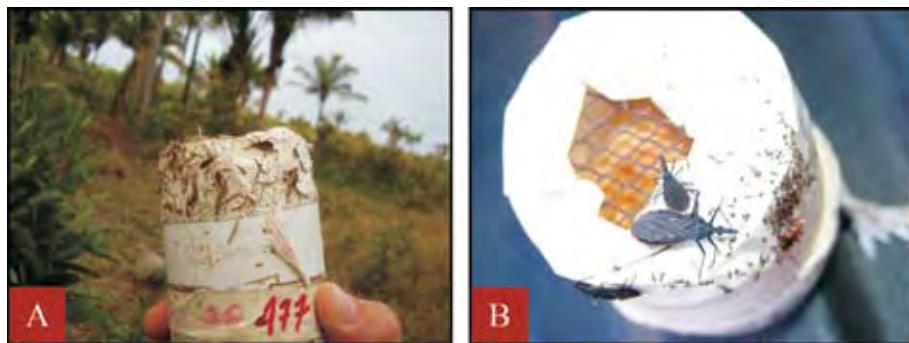


Figura 94: Armadilha de Noireau positiva para barbeiro: A) armadilha com triatomíneos aderidos a fita dupla face e a fita adesiva na base, com a numeração; B) detalhe da fita dupla face com triatomíneos aderidos.

Fotos: Catarina Macedo.



Figura 95: Tipos de ambientes onde podem ser colocadas armadilhas de Noireau: A e B) pedras; C) imbricamento das folhas de palmeiras.

Fotos: Catarina Macedo.

É muito importante manter o inseto íntegro para não prejudicar a identificação da espécie nem o exame para a investigação da presença de infecção pelo parasito *T. cruzi*. Evitar que o espécime entre em contato com algodão, caso venha a ser utilizado o mesmo dentro do frasco.

A

Nome: _____
Endereço: _____
Local de coleta: domicílio (<input type="checkbox"/>), peridomicílio (<input type="checkbox"/>) (<input type="checkbox"/>) quarto (<input type="checkbox"/>) sala (<input type="checkbox"/>) galinheiro (<input type="checkbox"/>) chiqueiro (<input type="checkbox"/>) outros
Data: _____

B

Nome: _____
Endereço: _____
Local de coleta: ambiente silvestre (<input type="checkbox"/>) sob casca de árvore (<input type="checkbox"/>) sob pedras (<input type="checkbox"/>) ninhos (<input type="checkbox"/>) palmeiras (<input type="checkbox"/>) toca de animais (<input type="checkbox"/>) outros (<input type="checkbox"/>)
Data: _____

Figura 96: Etiqueta com informações básicas sobre o inseto coletado.
A) ambiente de domicílio e peridomicílio; B) ambiente silvestre.



Figura 97: A) recipientes para transporte dos triatomíneos contendo papel de filtro no interior, dobrado em sanfona, para aumentar a superfície de contato; B) furos na tampa para a entrada de ar.

Fotos: Catarina Macedo.



Figura 98: Modo de acondicionamento do inseto morto:
A) pote; B) pote com papel para conter o inseto para evitar
que o inseto se danifique; C) pote com o inseto acondicionado.

Fotos: Catarina Macedo.

10.3 MONTAGEM DOS TRIATOMÍNEOS COLETADOS

A montagem dos insetos tem sua importância, uma vez que ao ser incorporada a uma coleção, fará parte de um acervo e estará disponível para estudiosos da área. Para isso, foi estabelecida uma padronização na montagem que varia entre as diferentes ordens de insetos (Figura 99).

A simetria bilateral, isto é, a semelhança entre os lados direito e esquerdo do triatomíneo, ratifica a importância da preservação de um dos lados, preservação que tornará possível a observação de todas as estruturas do inseto.

No caso dos percevejos, o inseto deve ser alfinetado, de preferência com alfinete entomológico (Figura 100A), no lado direito do pronoto (Figura 100B), **nunca no meio**, deixando, na parte superior do alfinete, um espaço suficiente para seu manuseio com a ponta dos dedos.

O inseto deve ficar perpendicular ao alfinete, para ser observado ao microscópio estereoscópico (Figura 100C).

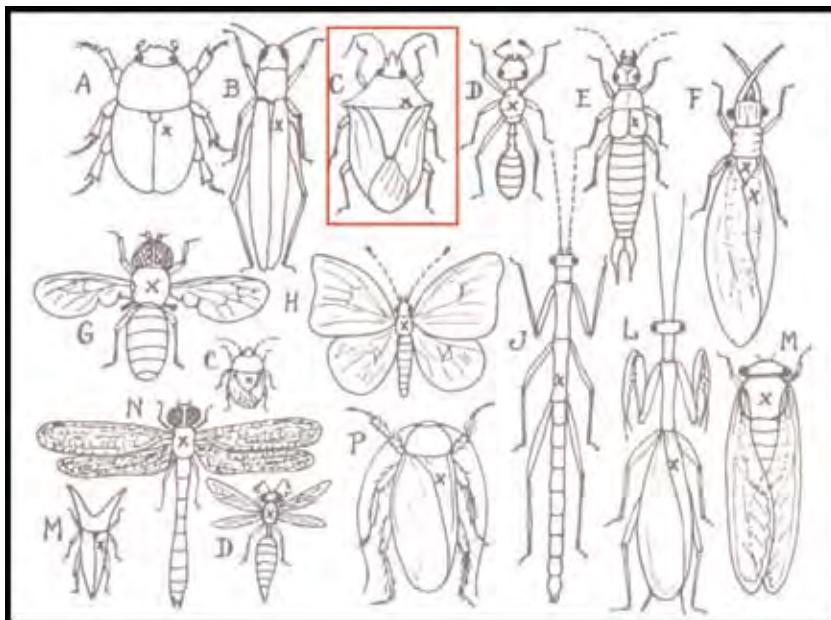


Figura 99: Ponto de inserção do alfinete entomológico, em destaque um inseto da ordem Hemiptera.

Adaptado por Teresa Cristina M. Gonçalves.



Figura 100: A) alfinete entomológico; B) local de inserção do alfinete, lado direito do pronoto; C) inseto alfinetado em posição perpendicular com as etiquetas.

Fotos: Catarina Macedo.

A identificação do espécime alfinetado, bem como o local de coleta e o nome de quem o classificou também são dados importantes. Sendo assim, depois que o inseto é alfinetado, juntam-se a ele três etiquetas: a primeira, com as informações do país, Estado, município, local de coleta, data e nome do coletor; a segunda, com o nome da espécie, do determinador e a data; e a terceira, opcional, com informações sobre o substrato de coleta (Figura 101), caso o ponto de coleta tenha sido georreferenciado (GPS), informar na 2^a etiqueta.

A	B	C
1 ^a etiqueta	2 ^a etiqueta	3 ^a etiqueta
País: _____ Estado: _____ Município: _____ Cidade: _____ Data: _____ GPS: _____	Espécie: _____ Data: _____ Determinador: _____	Espécie: _____ Substrato de coleta: _____

Figura 101: Modelo das etiquetas: A) identificação do local de coleta, da data e do coletor. Nesse caso, costuma-se colocar o sobrenome do coletor, seguido das iniciais do seu nome; B) identificação da espécie, da data e do coletor; C) outras informações (opcional).

Se o espécime analisado fizer parte de uma coleção, deverá ser numerado.

O inseto deverá ser mantido, de preferência, em gaveta com naftalina, fixada no canto da gaveta, em ambiente seco, livre de iluminação, uma vez que sua emissão descora o inseto (Figura 102). A naftalina deve ser reposta periodicamente.



A



B

Figura 102: Armário e gavetas da coleção entomológica do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ: A) gaveta; B) detalhe do interior da gaveta.

Fotos: Teresa Cristina M. Gonçalves.

10.4 INVESTIGAÇÃO ENTOMOLÓGICA

Esse procedimento consiste na realização de uma pesquisa no ambiente intradomiciliar e peridomiciliar, em uma área de incidência de triatomíneo ou uma área onde o mesmo foi encontrado.

A investigação da presença de triatomíneos deve ser feita em áreas previamente demarcadas de modo que, em caso de necessidade, outro agente de saúde, que desconheça a área, possa identificá-la e dar continuidade ao trabalho.

Para isso, a Secretaria de Saúde de cada município dispõe de um mapa dividido em microrregiões, havendo para cada, um número pré-determinado de agentes de saúde responsável pelo inquérito entomológico.

Todas as coletas realizadas no intradomicílio e/ou peridomicílio deverão ser georeferenciadas e notificadas através do preenchimento de uma ficha denominada SIOChagas 1 (Sistema de Operação de Campo Doença de Chagas), conforme modelo sugerido (Anexo 2).

Nessa ficha, deverão constar todas as informações referentes à Unidade Domiciliar tais como: localização, número de moradores, condições da moradia, tipos de anexos e dados da pesquisa e borrifação referentes ao tipo de parede, de teto, de piso e distância da área silvestre, bem como o resultado da pesquisa entomológica no intradomicílio e no peridomicílio, com o registro da captura do inseto e da presença de vestígios.

O material coletado é levado ao laboratório, onde será identificado quanto à espécie, local de captura, fase de desenvolvimento e à presença de infecção por tripanosomatídeo. O resultado desse trabalho é relatado, no modelo de ficha SIOChagas 2 (Anexo 2).

Visando uma abrangência de notificação que inclua não só as coletas do intradomicílio e peridomicílio, mas também do ambiente silvestre, foi adaptado um terceiro modelo de ficha SIOChagas (Junqueira ACV, Moreira CJC & Gonçalves TCM) (Anexo 3). Nessa ficha,

é considerada a distância do local de coleta em relação às edificações, o local de coleta, a fase de desenvolvimento do inseto coletado e o resultado da investigação para o parasito. Nesse caso, a pesquisa é realizada nas fezes, no tubo digestivo, na glândula salivar e na hemolinfa.

No Anexo 4 são apresentados os indicadores entomológicos de uso corrente para uma avaliação da pesquisa realizada.

10.5 DISSECÇÃO DO INSETO

10.5.1 TRATO INTESTINAL

Retirar as asas e, com o auxílio de uma tesoura, cortar as laterais do abdômen, na altura do conexivo, no sentido pôstero-anterior e por último transversalmente, para a remoção da região dorsal (Figura 103). As regiões do tubo digestivo que ficarão expostas serão o mesôntrio e o proctodeo, que deverão ser pinçadas em ambas as extremidades e transferidas para a placa de Petri, onde serão maceradas com salina. Deve-se tomar muito cuidado nessa etapa, principalmente se o inseto estiver ingurgitado, para não romper o tubo digestivo. Macerar bem o material e observar entre lâmina e lamínula ao microscópio.

10.5.2 GLÂNDULA SALIVAR:

Conforme foi feito no abdômen, continuar o corte lateral no tórax e por último transversalmente, para remover a região torácica dorsal. Pelo fato de as glândulas serem transparentes (exceto no gênero *Rhodnius* que são vermelhas) e esta região ser muito musculosa, é preciso muito cuidado na sua extração (Figura 104A). Uma maneira de se extrair as glândulas é puxando a cabeça. As glândulas saem presas ao esôfago, intestino anterior (Figura 104B).

As formas infectantes do parasito *Trypanosoma rangeli* são encontradas nas glândulas salivares, principalmente das espécies do gênero *Rhodnius*. Para investigar a presença desses parasitos, é necessário observá-los ao microscópio ótico, entre lâmina e lamínula, com um pouco de salina.

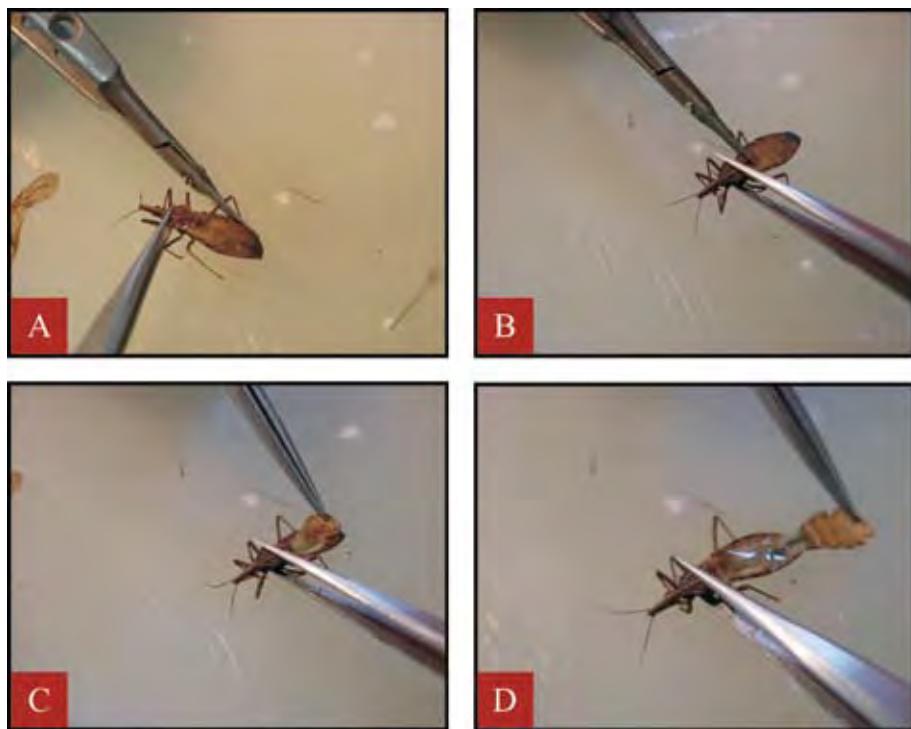


Figura 103: Técnica de dissecção para a retirada dos tergitos abdominais: A) corte lateral nos conexivos de ambos os lados; B) corte transversal no tergito próximo ao tórax; C) retirada dos tergitos; D) visualização das estruturas internas e da hemolinfa (brilho).

Fotos: Catarina Macedo.

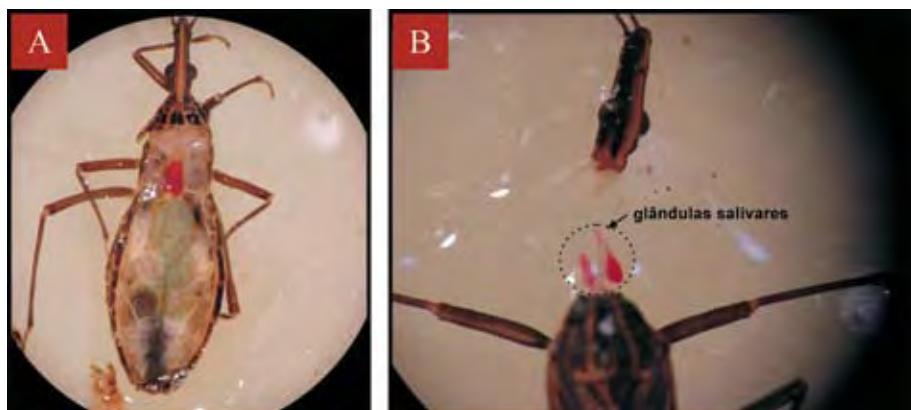


Figura 104: A) visualização das glândulas salivares no tórax; B) retirada das glândulas salivares, puxando pela cabeça.

Fotos: Catarina Macedo.

10.5.3 RETIRADA DE HEMOLINFA:

Quando se retira a asa ou a pata do inseto, é comum observar o extravasamento de um líquido transparente no seu ponto de inserção, que é o sangue do inseto, também denominado de hemolinfa (Figura 105).

A quantidade de hemolinfa está diretamente relacionada com o estado nutricional do inseto. Assim, caso o inseto tenha se alimentado recentemente, haverá uma quantidade maior de hemolinfa.

O parasito *Trypanosoma rangeli*, para chegar até a glândula salivar atravessa a parede do tubo digestivo e cai na cavidade do corpo, aonde na hemolinfa, vai para as glândulas salivares.

Outra maneira de investigar a presença daquele parasito é através da observação da hemolinfa entre lâmina e lamínula.



Figura 105: Visualização da hemolinfa após a retirada do hemélitro.

Foto: Catarina Macedo.

10.6 IDENTIFICAÇÃO DA FONTE ALIMENTAR

Existem técnicas laboratoriais de princípios distintos que permitem avaliar a fonte alimentar de insetos hematófagos. Dentre estas destacamos as seguintes:

10.6.1 TÉCNICA DE PRECIPITINA

A técnica de precipitina adaptada por Bull e King (1923) para identificação de fontes alimentares de insetos hematófagos, teve poucas mudanças no sentido do seu aprimoramento. Marassá *et al.* (2004) ressaltam que apesar do seu largo emprego, a sensibilidade e a especificidade são baixas, além de requerer grande quantidade de sangue. Essas dificuldades possibilitaram a necessidade do estudo de outros métodos para identificação.

Esta técnica consiste na identificação das prováveis fontes alimentares de insetos hematófagos utilizando diferentes metodologias: papel de filtro impregnado com fezes, fezes obtidas por compressão abdominal do inseto ou a análise do conteúdo intestinal total do inseto (Siqueira 1960). Neste caso, o inseto deve ser dissecado conforme descrito no ítem 1. O intestino depois de retirado é espalhado em um papel de filtro em forma de disco, dividido em setores numerados (Figura 106). Para cada amostra é feito um esfregaço do conteúdo intestinal, a qual é devidamente identificada e protocolada, de acordo com a numeração. Após seco, o papel de filtro deve ser guardado na geladeira, em envelope, para posterior envio ao laboratório que fará a análise.

10.6.2 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Na década de 80, os pesquisadores começaram a utilizar a técnica imunoenzimática para a identificação das fontes alimentares (Burkot *et al.*, 1981). Apesar de ser um ensaio muito sensível e permitir automatização, sua especificidade pode ser comprometida entre outros fatores pela qualidade e quantidade do anti-soro empregado no ensaio (Duarte, 1997; Farfán, 2007).

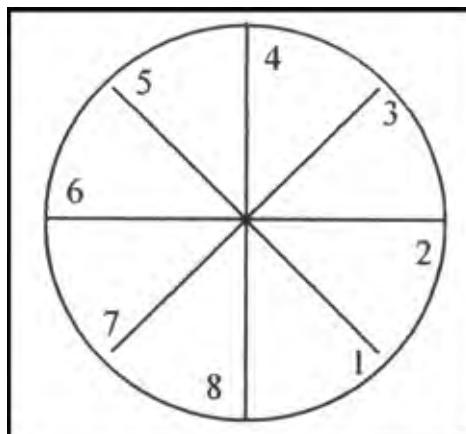


Figura 106: Disco de papel de filtro para a impregnação do conteúdo intestinal do triatomíneo.

Desenho: Teresa Cristina M. Gonçalves.

Nesta técnica as fezes são colhidas por compressão abdominal, diluídas em 50 microlitros de PBS (pH 7,2 a 0,01M) e mantidas em tubos Eppendorf. Os papéis de filtro que foram os frascos de transporte dos triatomíneos, e que ficam impregnados de fezes, também podem ser utilizados. Estes são eluídos em 50 microlitros de PBS durante 12 horas, e centrifugados obtendo-se assim os extratos. Ambos deverão ser mantidos em freezer -20°C até o teste com os anti-soros (Siqueira, 1960).

Procedimento Básico: *Vide dissertação mestrado de Duarte (1997).*

10.6.3 MARCADORES MOLECULARES

O emprego da técnica de marcadores moleculares tem mostrado resultados promissores na identificação das fontes alimentares. As metodologias mais utilizadas são os iniciadores específicos da sequência do DNA mitocondrial de unidades conhecidas como citocromos (citocromo B e citocromo oxidase) para identificação de fontes alimentares de artrópodes hematófagos vetores. Os ensaios com esses iniciadores na PCR apresentam alta sensibilidade e especificidade em relação aos procedimentos anteriormente relatados (Mukabana et

al., 2002; Chow-Shaffer *et al.*, 2000; Steuber *et al.*, 2005; Kirstein & Gray 1996; Townzen et al; 2008; Mota *et al.*, 2007).

Procedimento Básico: *Vide artigos de Pizarro & Stevens(2008) e Abbasí et al (2009).*

10.7 MATERIAL UTILIZADO PARA A DISSECÇÃO:

- placa de Petri com parafina;
- alfinete;
- lâminas e lamínulas bem limpas em álcool 70%;
- 2 pinças ponta fina;
- 1 tesoura pequena (tipo de unha);
- solução salina;
- luva cirúrgica;
- máscara protetora.

BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO-JORGE, T.; CASTRO, S.L. DE (org). *Doença de Chagas: Manual para Experimentação Animal*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 368 p, 2000.
- BARRETO, M.P. Estudos sobre reservatórios e vectores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. XXII. Modificações dos focos naturais da tripanossomíase americana e suas consequências. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. I, n 4, p. 167-173, 1967.
- BARRETT, T.V. Current research on Amazonian Triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 83, Suppl. 1, p. 441-7, 1988.
- BARTH, R. O complexo das glândulas salivares de *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 52 (3/4), p. 518 – 583, 1954.
- BULL, C.G.; KING, W.V. The identification of the blood meal of mosquitoes by means of the precipitin test. *American Journal Hygiene* v.3, p. 491-96, 1923.
- BURKOT, T.R.; GOODMAN, W.G; DEFOLIART, G.R. Identification of mosquito blood meals by enzyme-linked immunosorbent assay. *American Journal of Tropical Hygiene* v.30, p. 1336-1341, 1981.
- BUZZI, Z.J. Entomologia Didática - 4.ed – Curitiba: Ed UFPR. 348p. , 2005.
- CANALE, D.M.; JURBERG, J.; CARCAVALLO, R.U.; GALVÃO, C.; GIRÓN, I.G.; SEGURA, C.A.M.; ROCHA, D.S.; MARTÍNEZ A. *Bionomia de algumas espécies*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, p.839-890, 1999.
- CARCAVALLO, R.U.; GIRÓN, I.G.; JURBERG, J.; LENT H. (org). *Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas*, v. I. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 393 p, 1997.
- CARCAVALLO, R.U.; GIRÓN, I.G.; JURBERG, J.; LENT, H. (org) 1997. *Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas*, v. II. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 394-733, 1997.
- CARCAVALLO, R.U.; GIRON, I.G.; JURBERG, J.; LENT, H. (org). *Atlas dos vetores da doença de Chagas nas Américas*, v. III. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p.734-1217, 1997.
- CARCAVALLO, R.U.; JURBERG, J.; LENT, H.; NOIREAU, F.; GALVÃO C. Phylogeny of the Triatominae (*Hemiptera, Reduviidae*). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomología y Vectores*, v.7, p. 1-99, 2000.
- CARO-RIAÑO, H.; JARAMILLO, N.; DUJARDIN, J.P. Growth changes in *Rhodnius pallescens* under simulated domestic and sylvatic conditions. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 9; p. 162-8, 2009.
- COSTA, J. *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (*Hemiptera, Reduviidae, Triatominae*): estudos morfológicos, biológicos e isoenzimáticos sobre diferentes padrões cromáticos, 100 p, 1997. (Tese de doutorado), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro.
- COSTA, J. The synanthropic process of Chagas disease vectors in Brazil, with special attention to *Triatoma brasiliensis* Neiva, 1911 (*Hemiptera: Reduviidae: Triatominae*) populations, genetical, ecological and epidemiological aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 239-241, 1999.

COURA, J.R. *Dinâmica das doenças Infecciosas e Parasitárias*, Rio de Janeiro, ed. Guanabara Koogan, vol I, 1132 p, 2005.

DIAS, J.C.P. Controle de vetores da doença de Chagas no Brasil e risco de reinvasão domiciliar por vetores secundários. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 83, p. 387-391, 1988.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (org) 1997. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Rio de Janeiro: ed. FIOCRUZ, 486 p, 1997.

DUARTE, R. Ensaio Imunoenzimático ELISA para identificação experimental de fontes alimentares em *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835) (Hemiptera: Reduviidae), Tese de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRZ, 103 pp. 1997.

DUJARDIN, J.P.; CHAVEZ, T.; MORENO, J.M.; MACHANE, M.; NOIREAU, F.; SCHOFIELD, C.J. Comparison of isoenzyme electrophoresis and morphometric analysis for phylogenetic reconstruction of the Rhodniini (Hemiptera: Reduviidae:Triatominae). *Journal of Medical Entomology*, v. 36, p. 653-9, 1999.

DUJARDIN, J.P.; PANZERA, P.; SCHOFIELD, C. Les vecteurs de la maladie de Chagas. *Recherches taxonomiques, biologiques et génétiques, Académie Royale des Sciences d'Outre-Mer, Bruxelles, Classe des Sciences Naturelles et Médicales*, NS v. 24, n. 5, 2000.

E. CHOW-SHAFFER, E.; SINA, B.; HAWLEY, W.A.; DE BENEDICTIS, J.; SCOTT, T.W. Laboratory and field evaluation of polymerase chain reaction-based forensic DNA profiling for use in identification of human blood meal sources of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 37, p. 492 - 502, 2000.

FARFÁN, A.E.; GUTIÉRREZ, R.; ÂNGULO, V.M. ELISA para la identificación de los patrones alimentarios de Triatominae em Colombia. *Revista de Salud Pública* v.9, p. 602-608, 2007.

FORATTINI, O.P.; FERREIRA, O.A.; ROCHA E SILVA, E.O. DA; RABELLO, E.X., dos Santos, J.L. Aspectos Ecológicos da Tripanossomíase Americana. . II Dispersão local de triatomíneos nos ecótopos naturais e artificiais. *Revista de Saúde Pública*, v. 5, p. 163-191, 1971.

FORATTINI, O.P.; FERREIRA, O.A.; SOUZA, J.M.P. DE; RABELLO, E.X.; ROCHA E SILVA, E.O. DA; RODRIGUES, F.W. Medida da infestação domiciliar por Triatomá sordida. *Revista de Saúde Pública*, v. 7, p.241-250, 1973.

FORATTINI, O.P.; FERREIRA, O.A.; ROCHA E SILVA, E.O. DA; RABELLO, E. X. Aspectos ecológicos da tripanossomíase americana. XIV. Persistência e potencial de domiciliação de populações triatomínicas silvestres em região de intensa atividade agropecuária. *Revista de Saúde Pública*, v.13, p. 123-146, 1979.

FORATTINI, O.P. Biogeografia, origem e distribuição da domiciliação de triatomíneos no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.14, p. 265-299, 1980.

FREITAS, S.P.C.; FREITAS, A.L.C.; PRAZERES, S.M.; GONÇALVES, T.C.M. Influence of anthropic habits in the dispersion of *Triatoma pseudomaculata* Correa & Espínola, 1964 through Mimosa tenuiflora (Willdenow) (Mimosaceae) in the State of Ceará, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, p. 333-336, 2004.

FREITAS, S.P.C.; LOROSA, E.S.; RODRIGUES, D.C.; FREITAS A.L.C.; GONÇALVES T.C.M. Feeding patterns of *Triatoma pseudomaculata* in the state of Ceará, Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v. 39, p. 27-32, 2005.

GALVÃO, C.; CARCAVALLO, R.U.; ROCHA, D.S.; JURBERG J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* v. 202, p.1-36, 2003.

GARCIA, E.S.; AZAMBUJA, P. Fisiologia de triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi*. In: Z Brener, ZA Andrade, M Barral-Neto. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.41-47, 2000.

GONÇALVES, T.C.M.; JURBERG, J.; COSTA, J.M.; SOUZA, W. Estudo morfológico comparativo de ovos de *Triatoma maculata* (Erichson, 1848) e *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 263-276, 1985.

GONÇALVES, T.C.M.; CUNHA, V.; OLIVEIRA, E.; JURBERG, J. Various aspects of the biology of *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Espínola, 1964 in laboratory conditions (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 275-280, 1997.

GONÇALVES, T.C.M.; OLIVEIRA, E.; DIAS, L.S.; ALMEIDA, M.D.; NOGUEIRA W.O.; ÁVILA-PIRES, F.D. An investigation on the ecology of *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) and its possible role in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in locality of Triunfo, Santa Maria Madalena municipal district, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 711-717, 1998.

GONÇALVES, T.C.M. Aspectos ecológicos de *Triatoma vitticeps* (Stål, 1859) (Hemiptera, Reduviidae), com caracterização das amostras de *Trypanosoma cruzi*, 1909 (Kinetoplastida, Tripanosomatidae) isoladas deste triatomíneo no Município de Santa Maria Madalena, Estado do Rio de Janeiro. 125 p. (Tese de doutorado) Instituto Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro, 2000.

GRAZIA, J.; SCHUH, R.T.; WHEELER, W.C. Phylogenetic relationships of family groups in Pentatomoidae based on morphology and DNA sequences (Insecta: Heteroptera). *Cladistics* v.24, p. 1-45, 2008.

GRIMALDI, D.; ENGEL, M.S. Evolution of the insects. Cambridge University Press, p. 755, 2005.

GRINGORTEN, J.L.; FRIEND, W.G. Tissue development in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): dry weight changes in fed and unfed post-ecdysial males. *Canadian Entomologist*, v. 11, p. 735-740, 1979.

HOCHKIRCH, A.; DEPPERMAN, J.; GRÖNING, J. Phenotypic plasticity in insects: the effects of substrate color on the coloration of two ground-hoppers insects. *Evolution & Development*, v. 10; p. 350-9, 2008.

JARAMILLO, N.; CASTILLO, D.; WOLFF, M. Geometric morphometric differences between *Panstrongylus geniculatus* from field and laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 667-73, 2002.

JURBERG, J.; ROCHA, D.S.; GALVÃO, C. *Rhodnius zeledoni* sp. nov. afim de *Rhodnius paraensis* Sherlock, Guitton & Miles, 1977 (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Biota Neotropica*, v. 9, p. 123-8, 2009.

LACOMBE, D. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). VII. Estudo anatômico do ducto intestinal do *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 55, p. 69 - 111, 1957.

LACOMBE, D. Estudos anatômicos e histológicos sobre a subfamília Triatominae (Heteroptera, Reduviidae). Parte XXI: Estudo comparado do sistema traqueal em *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 63, p. 65 - 105, 1965.

LACOMBE, D. Anatomia e Histologia das Glândulas Salivares nos Triatomíneos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 557-564, 1999.

LEHANE, M.J.; SCHOFIELD, C.J. Field experiments on dispersive flight by *Triatoma infestans*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 75, p. 399-400, 1981.

LEHANE, M.J.; SCHOFIELD, C.J. 1982. Flight initiation in *Triatoma infestans*. *Bulletin of Entomological Research*, v. 72, p. 497-510, 1982.

LEHANE, M.J.; MCEWAN, P.K.; WHITAKER, C.J.; SCHOFIELD, C.J. The role of temperature and nutritional dependence in flight initiation by *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, v. 52, p. 27-38, 1992.

LENKO, K.; PAPAVERO, N. Insetos no Folclore. Série Conselho Estadual de Artes e Ciências Humanas. *Coleções Folclore* n. 18, São Paulo. 1979.

LENT, H; JURBERG, J. O gênero *Rhodnius* Stål, 1859, com um estudo sobre a genitália d (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae). *Revista Brasileira de Biologia* v. 29, p. 487-560, 1969.

LENT, H; JURBERG, J. Sobre a variação intra-específica em *Triatoma dimidiata* (Latreille) e *Triatoma infestans* (Klug) (Hemiptera, Reduviidae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 285-299, 1985.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas disease. *Bulletin American Museum Natural History*, v. 163, p. 127-520, 1979.

LUITGARDS-MOURA, J.F. Aspectos Epidemiológicos da Doença de Chagas em áreas de Colonização Agrícola no Estado de Roraima, Brasil. 82 p. (Tese de Doutorado) Instituto Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, 2001.

LUITGARDS-MOURA, J.F.; BORGES-PEREIRA, J.; COSTA, J.; ZAUZA, P.L.; ROSA-FREITAS, M.G. On the possibility of autochthonous Chagas disease in Roraima, Amazon region, Brazil, 2000-2001. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 47, p. 45-54, 2005a.

LUITGARDS-MOURA, J.F.; VARGAS, A.B.; ALMEIDA, C.E.; MAGNO-ESPERANÇA, G.; AGAPITO-SOUZA, R.; FOLLY-RAMOS, E.; COSTA, J.; TSOURIS, P.A. *Triatoma maculata* (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) population from Roraima, Amazon region, Brazil, has some bionomic characteristics of a potential Chagas disease vector. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.47, p. 131- 137, 2005b.

LYMAN, D.F.; MONTEIRO, F.A.; ESCALANTE, A.A.; CORDON-ROSALES, C.; WESSON, D.M.; DUJARDIN, J.P.; BEARD, C.B. Mitochondrial DNA sequence variation among triatomine vectors of Chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 60, p. 377-86, 1999.

MONTEIRO, F.A.; WESSON, D.M.; DOTSON, E.M.; SCHOFIELD, C.J.; BEARD, C.B. Phylogeny and molecular taxonomy of the Rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 62, p. 460-65, 2000.

MARASSÁ, A.M.; CONSALES, C.A.; GALATI, E.A.B. Padronização da técnica do ELISA de captura, no sistema avidina-biotina para a identificação do sangue ingerido por *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* v. 37, p.441-446, 2004.

MONTEIRO F.A.; BARRETT T.; FITZPATRICK S.; CORDON-ROSALES C.; FELCIANGELI D.; BEARD C.B. Molecular phylogeography of the Amazonian Chagas disease vectors *Rhodnius prolixus* and *R. robustus*. *Molecular Ecology*, v. 12, p. 997- 1006, 2003.

NOIREAU, F.; BOSSENO, M.F.; CARRASCO, R.; TELLERIA, J.; VARGAS, F.; CAMACHO, C.; YAKSIC, N.; BRENIÈRE, F. Sylvatic triatomines (Hemiptera: Reduviidae) in Bolivia. Trends towards domesticity and possible infection with *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 32, p. 594-598, 1995.

NOIREAU, F.; CORTEZ, M.R.; GÜRTLER, R. Los Focos Silvestres de *Triatoma infestans* en Bolivia. In: Triatominos de Bolivia y la enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud y Desportes, Programa Nacional de Chagas, Bolivia, p. 205-213, 2007.

PAVAN, M. G.; MONTEIRO, F.A. A multiplex PCR assay that separates *Rhodnius prolixus* from members of the *Rhodnius robustus* cryptic species complex (Hemiptera: Reduviidae). *Tropical Medicine and International Health*, v. 12, p. 751- 758, 2007.

REY, L. Parasitologia. 3^a ed. [S.I]: Guanabara Koogan, p.856, 2001.

RICARDO-SILVA, A.H. Eco-biologia de triatomíneos no município de Oriximiná, Estado do Pará, Amazônia, Brasil, 73p, (Tese de Mestrado), Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, 2010.

ROJAS, A.; VINHAES, M.; RODRIGUES, M.; MONROY, J.; NAVINDRA, P.; AZNAR, C.; NÁQUINA, C.; HIWAT, H.; BENITEZ, J. Reunião Internacional sobre Vigilância e Prevenção da Doença de Chagas na Amazônia: implementação da Iniciativa Intergovernamental de Vigilância e Prevenção da doença de Chagas na Amazônia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 38, n.1, 2005.

SANTOS-MALLET, J.R. Vetores da Doença de Chagas e sua relação com o Hospedeiro Vertebrado e o Parasito. In: Araújo-Jorge TC, Castro SL. Doença de Chagas, Manual para Experimentação Animal. Rio de Janeiro FIOCRUZ, 368 p, 2000.

SCHACHTER-BROIDER, J.; DUJARDIN, J.P.; KITRON, U.; GÜRTLER, E. Spacial Structuring of *Triatoma infestans* (Hemiptera, Reduviidae) Populations from Northwestern Argentina Using Wing Geometric Morphometry. *Journal of Medical Entomology*, v. 41, p. 643-9, 2004.

SCHOFIELD, C.J.; MATTHEWS, J.N. Theoretical approach to active dispersal and colonization of houses by *Triatoma infestans*. *Journal of Tropical Medical and Hygiene*, v. 88, n. 3, p. 211-22, 1985.

SCHOFIELD, C.J.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J.P. The process of domestication in Triatominae. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, Suppl 1, p. 375-8, 1999.

SCHOFIELD, C.J.; GALVÃO, C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, v. 110, n 2-3, p 88-100, 2009.

SCHUH, R.T.; SLATER, J.A. True bugs of the World (Hemiptera, Heteroptera). *United States of America, Cornell University*, p. 336, 1995.

SCHWEIGMANN, N.; VALLVE, S.; MUSCIO, O.; GHILLINI, M.; ALBERTI, A.; WISNIVESKY-COLLI, C. Dispersal flight by *Triatoma infestans* in an arid area of Argentina. *Medical Veterinary Entomology*, v. 2, n. 4, p. 401-4, 1988.

SERRA-FREIRE, N.; MELLO, R.P. Entomologia & Acarologia na Medicina Veterinária. L.F. Livros, 200 p, 2006.

SILVA, I.G.; SILVA, H.H.G.; CAMARGO, M.F.; MOURA, A.F.; ELIAS, M.; SANTOS, A.H. Distribuição dos vetores da Tripanosomiase Americana capturados no ambiente domiciliar, no Estado de Goiás, no período de 1984/88. *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil*, v. 21, p. 139-154, 1992.

SILVA, I.G.; SILVA, H.H.G.; SANTOS, V.L.V; SILVA, J.L.; CAMARGO, M.F.; NAKAMO, H.; SAHLA, L.A.; ELIAS, M.. Distribuição dos vetores da Tripanosomiase Americana capturados no ambiente domiciliar, no Estado do Tocantins, no período de 1984/1988. *Revista de Patologia Tropical*, v. 20, p. 165- 191, 1991.

SIQUEIRA, A.F. Estudos sobre a reação da precipitina aplicada à identificação de sangue ingerido por triatomíneos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 2, p.41-53, 1960.

TRIPLEHORN, C.A.; JONNISON, N.F. Estudo dos insetos. 7^a Ed. São Paulo, Ed. Cengage Learning, p. 809, 2011.

WEIRACH, C. Cladistic analysis of Reduviidae (Heteroptera: Cimicomorpha) based on morphological characters. *Systematic Entomology*, v. 33, p. 229-274, 2008.

WILLIAMS, N.G.; SCHOFIELD, C.J. The role of temperature in flight initiation of triatomine bugs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 79, p. 282, 1985.

ANEXO 1



DATASUS

SIOChagas

Sistema de Operação de Campo Doença de Chagas

A 1-Localização da Unidade Domiciliar			Data da Atividade	
Código do Município		Nome do Município		
Código da Localidade		Nome da Localidade		
Nº casa	Comp	Quadra	Situação da Casa <input type="checkbox"/> 1 - Nova <input type="checkbox"/> 2 - Demolida	Pendência de Pesquisa <input type="checkbox"/> 1- Recusa <input type="checkbox"/> 2- Casa Fechada
Nº de Habit		Nº de Anexos	Pendência da Borrifação <input type="checkbox"/> 1- Recusa <input type="checkbox"/> 2-Casa Fechada	
			Tipos de Anexos <input type="checkbox"/> 1- Galinheiro <input type="checkbox"/> 2- Paiol <input type="checkbox"/> 3- Chiqueiro <input type="checkbox"/> 4- Outros	
Melhorias Habitacionais <input type="checkbox"/> 1- Sim <input type="checkbox"/> 2- Não			Tipo de Melhoria Habitacional <input type="checkbox"/> 1- Pública/MS <input type="checkbox"/> 2- Privada <input type="checkbox"/> 3- Outros	
2- Dados da Pesquisa e Borrifação				
Tipo de Parede <input type="checkbox"/> 1-Alvenaria C/Reb. <input type="checkbox"/> 2-Alvenaria S/Reb. <input type="checkbox"/> 3- Barro C/Reb. <input type="checkbox"/> 4-Barro S/Reb. <input type="checkbox"/> 5-Madeira <input type="checkbox"/> 6-Outros				
Tipo de Teto <input type="checkbox"/> 1-Telha <input type="checkbox"/> 2-Palha <input type="checkbox"/> 3-Madeira <input type="checkbox"/> 4-Metálico <input type="checkbox"/> 5-Outros				
Tipo de Piso <input type="checkbox"/> 1- Cimento/Cerâmica <input type="checkbox"/> 2- Terra Batida <input type="checkbox"/> 3- Madeira <input type="checkbox"/> 4- Outros			Proximidade de Área Sílvreste <input type="checkbox"/> 1- Menor que 200 mts <input type="checkbox"/> 2- Maior que 200 mts	
Intradomicílio			Peridomicílio	
Captura	Vestígios	Local de Captura <input type="checkbox"/> Triatominéio <input type="checkbox"/> Ovos <input type="checkbox"/> Sala <input type="checkbox"/> Cozinha	Captura	Vestígios
<input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Quarto <input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Triatominéio <input type="checkbox"/> Ovos <input type="checkbox"/> Galinheiro <input type="checkbox"/> Paiol	<input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> Chiqueiro <input type="checkbox"/> Outros
Tipo de Desalojante		Nº de Cargas	Tipo de Inseticida	
Nº do PIT		CPF do Ag. Saúde	Assinatura do Agente de Saúde	
Data do Visto		Visto do Chefe da Operação de Campo		ETIQUETA

SIOChagas-1

ANEXO 2



CDATASUS

SIOChagas
Sistema de Operação de Campo Doença de Chagas

1 - Dados de Identificação:

Município:	Localidade:	Nº casa:	Qd:
Número de Etiqueta	Data do Exame	Responsável pelo Exame	

2. Dados sobre Exame de Triatomíneos

Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome	<input type="checkbox"/> 1- Intra domicílio <input type="checkbox"/> 2- Peri domicílio	<input type="checkbox"/> 1- Galinheiro <input type="checkbox"/> 2- Paiol <input type="checkbox"/> 3- Chiqueiro <input type="checkbox"/> 4- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninfa <input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho <input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 1- Positivo <input type="checkbox"/> 2- Negativo <input type="checkbox"/> 3- Não Examinado

Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome	<input type="checkbox"/> 1- Intra domicílio <input type="checkbox"/> 2- Peri domicílio	<input type="checkbox"/> 1- Galinheiro <input type="checkbox"/> 2- Paiol <input type="checkbox"/> 3- Chiqueiro <input type="checkbox"/> 4- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninfa <input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho <input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 1- Positivo <input type="checkbox"/> 2- Negativo <input type="checkbox"/> 3- Não Examinado

Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome	<input type="checkbox"/> 1- Intra domicílio <input type="checkbox"/> 2- Peri domicílio	<input type="checkbox"/> 1- Galinheiro <input type="checkbox"/> 2- Paiol <input type="checkbox"/> 3- Chiqueiro <input type="checkbox"/> 4- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninfa <input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho <input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 1- Positivo <input type="checkbox"/> 2- Negativo <input type="checkbox"/> 3- Não Examinado

Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome	<input type="checkbox"/> 1- Intra domicílio <input type="checkbox"/> 2- Peri domicílio	<input type="checkbox"/> 1- Galinheiro <input type="checkbox"/> 2- Paiol <input type="checkbox"/> 3- Chiqueiro <input type="checkbox"/> 4- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninfa <input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho <input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 1- Positivo <input type="checkbox"/> 2- Negativo <input type="checkbox"/> 3- Não Examinado

Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome	<input type="checkbox"/> 1- Intra domicílio <input type="checkbox"/> 2- Peri domicílio	<input type="checkbox"/> 1- Galinheiro <input type="checkbox"/> 2- Paiol <input type="checkbox"/> 3- Chiqueiro <input type="checkbox"/> 4- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninfa <input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho <input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 1- Positivo <input type="checkbox"/> 2- Negativo <input type="checkbox"/> 3- Não Examinado

Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome	<input type="checkbox"/> 1- Intra domicílio <input type="checkbox"/> 2- Peri domicílio	<input type="checkbox"/> 1- Galinheiro <input type="checkbox"/> 2- Paiol <input type="checkbox"/> 3- Chiqueiro <input type="checkbox"/> 4- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninfa <input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho <input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 1- Positivo <input type="checkbox"/> 2- Negativo <input type="checkbox"/> 3- Não Examinado

Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome	<input type="checkbox"/> 1- Intra domicílio <input type="checkbox"/> 2- Peri domicílio	<input type="checkbox"/> 1- Galinheiro <input type="checkbox"/> 2- Paiol <input type="checkbox"/> 3- Chiqueiro <input type="checkbox"/> 4- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninfa <input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho <input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 1- Positivo <input type="checkbox"/> 2- Negativo <input type="checkbox"/> 3- Não Examinado

ANEXO 3

SIOChagas (Adaptada por Junqueira, ACV; Moreira, CJC; Gonçalves, TCM)
Sistema de Operação de Campo - Doença de Chagas

1 - Dados de Identificação:

Município:	Localidade:	Nº casa:	Qd:
Estado:	Data da Captura:		
Localização no GPS:	Rio mais próximo ou estrada:		
Número de Etiqueta	Data do Exame	Responsável pelo Exame	

2- Dados sobre Exame de Triatomíneos

Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome				
		<input type="checkbox"/> 3-Extra domicílio menos de 1km da casa	<input type="checkbox"/> 5- Mata <input type="checkbox"/> 6- Piaçabal <input type="checkbox"/> 7- Palmeira <input type="checkbox"/> 8- Cesto de transporte <input type="checkbox"/> 9- Barco <input type="checkbox"/> 10- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninf. () ^{1°} () ^{2°} () ^{3°} () ^{4°} () ^{5°}	<input type="checkbox"/> Pesquisa 1.Fezes() 2.Tubo d.() 3.Hemolinfa() 4.Glândula Salivar() 4- (+) T.cruzi
		<input type="checkbox"/> 4-Extra domicílio mais de 1km da casa		<input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho	<input type="checkbox"/> 5- (+) T.rangeli 6- (-) Neg. protoz.
				<input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 7- Tc. e Tr. (mista)
					<input type="checkbox"/> 8- Não examinado
Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome				
		<input type="checkbox"/> 3-Extra domicílio menos de 1km da casa	<input type="checkbox"/> 5- Mata <input type="checkbox"/> 6- Piaçabal <input type="checkbox"/> 7- Palmeira <input type="checkbox"/> 8- Cesto de transporte <input type="checkbox"/> 9- Barco <input type="checkbox"/> 10- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninf. () ^{1°} () ^{2°} () ^{3°} () ^{4°} () ^{5°}	<input type="checkbox"/> Pesquisa 1.Fezes() 2.Tubo d.() 3.Hemolinfa() 4.Glândula Salivar() 4- (+) T.cruzi
		<input type="checkbox"/> 4-Extra domicílio mais de 1km da casa		<input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho	<input type="checkbox"/> 5- (+) T.rangeli 6- (-) Neg. protoz.
				<input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 7- Tc. e Tr. (mista)
					<input type="checkbox"/> 8- Não examinado
Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome				
		<input type="checkbox"/> 3-Extra domicílio menos de 1km da casa	<input type="checkbox"/> 5- Mata <input type="checkbox"/> 6- Piaçabal <input type="checkbox"/> 7- Palmeira <input type="checkbox"/> 8- Cesto de transporte <input type="checkbox"/> 9- Barco <input type="checkbox"/> 10- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninf. () ^{1°} () ^{2°} () ^{3°} () ^{4°} () ^{5°}	<input type="checkbox"/> Pesquisa 1.Fezes() 2.Tubo d.() 3.Hemolinfa() 4.Glândula Salivar() 4- (+) T.cruzi
		<input type="checkbox"/> 4-Extra domicílio mais de 1km da casa		<input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho	<input type="checkbox"/> 5- (+) T.rangeli 6- (-) Neg. protoz.
				<input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 7- Tc. e Tr. (mista)
					<input type="checkbox"/> 8- Não examinado
Espécie de Triatomíneo		Captura	Local de Captura	Estádio	Resultado
Código	Nome				
		<input type="checkbox"/> 3-Extra domicílio menos de 1km da casa	<input type="checkbox"/> 5- Mata <input type="checkbox"/> 6- Piaçabal <input type="checkbox"/> 7- Palmeira <input type="checkbox"/> 8- Cesto de transporte <input type="checkbox"/> 9- Barco <input type="checkbox"/> 10- Outros	<input type="checkbox"/> 1- Ninf. () ^{1°} () ^{2°} () ^{3°} () ^{4°} () ^{5°}	<input type="checkbox"/> Pesquisa 1.Fezes() 2.Tubo d.() 3.Hemolinfa() 4.Glândula Salivar() 4- (+) T.cruzi
		<input type="checkbox"/> 4-Extra domicílio mais de 1km da casa		<input type="checkbox"/> 2- Adulto Macho	<input type="checkbox"/> 5- (+) T.rangeli 6- (-) Neg. protoz.
				<input type="checkbox"/> 3- Adulto Fêmea	<input type="checkbox"/> 7- Tc. e Tr. (mista)
					<input type="checkbox"/> 8- Não examinado

ANEXO 4

Guia para amostragem aplicada a atividades de vigilância e controle vetorial da doença de Chagas

VI. APÊNDICES

APÊNDICE 1: Indicadores entomológicos de uso corrente *

Dispersão = $\frac{\text{localidades com captura domiciliar de triatomíneos}}{\text{localidades pesquisadas}}$

Infestação Domiciliar ⁽¹⁾ = $\frac{\text{UDs com captura de triatomíneos}}{\text{UDs pesquisadas}}$

Colonização ⁽²⁾ = $\frac{\text{UDs com captura de ninhas de triatomíneos}}{\text{UDs com captura de triatomíneos}}$

Infecção Natural = $\frac{\text{número de exemplares de triatomíneos infectados por } T. cruzi}{\text{número de exemplares de triatomíneos examinados}}$

Densidade = $\frac{\text{número de exemplares de triatomíneos capturados}}{\text{número de UD pesquisadas}}$

* proporções que usualmente se expressa como percentagens

(1) a infestação domiciliar (para UD: unidade domiciliar) frequentemente, por interesse epidemiológico, se discrimina para o intradomicílio e o peridomicílio

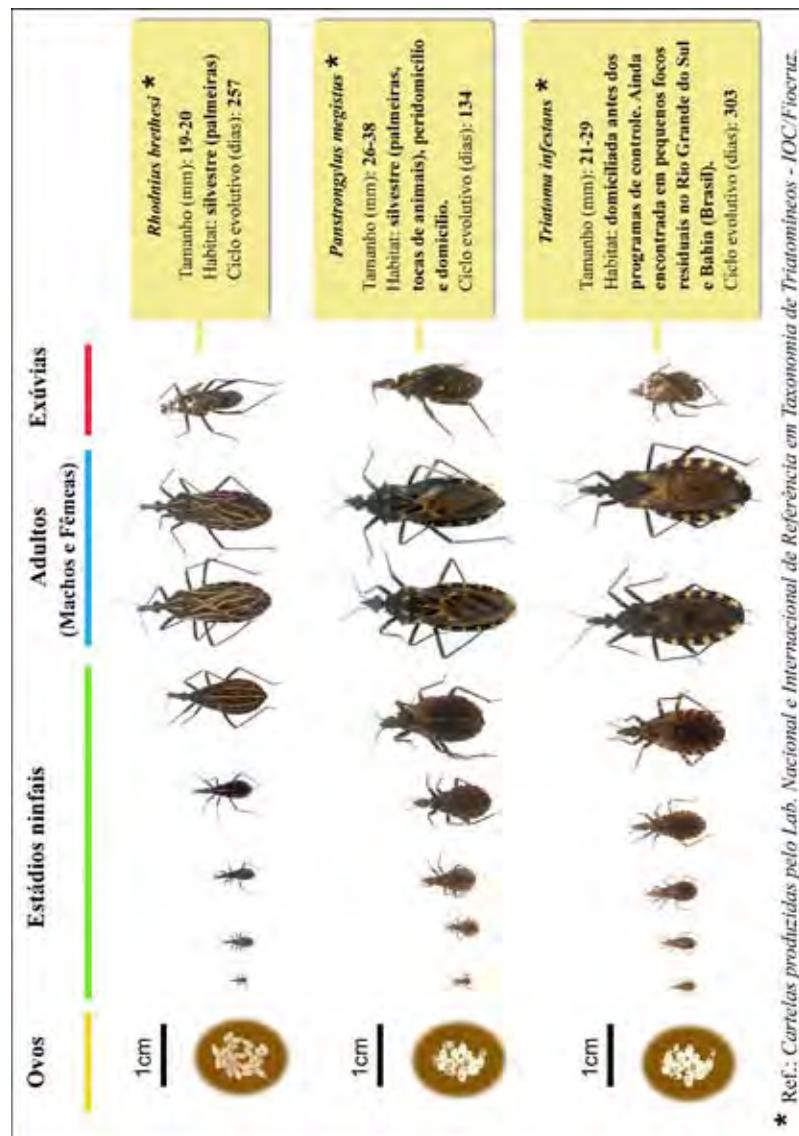
(2) a colonização que particularmente importa é a do intradomicílio

Definição de Localidade - conglomerado de domicílios ou de unidades domiciliares (U.D.).

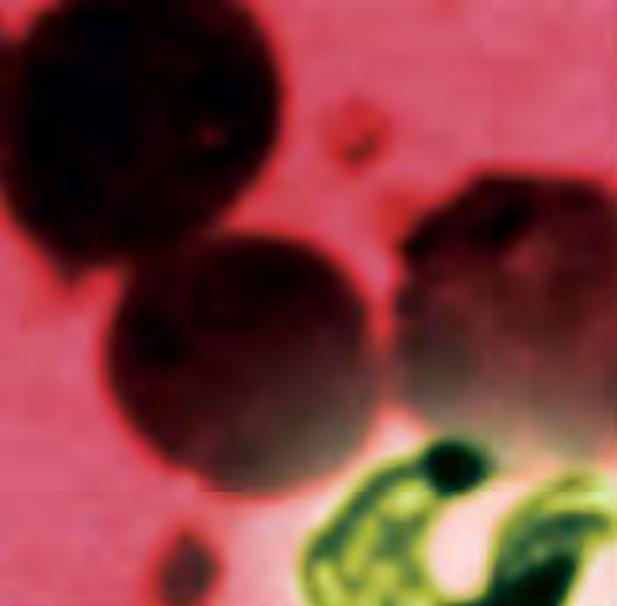
Definição de Unidades Domiciliares (U.D.) - são conglomerados de pessoas, sendo constituída pela casa (intradomicílio) e seu correspondente peridomicílio.

Fonte: SILVEIRA, A.C.; SANCHES, O. Guia para amostragem aplicada a atividades de vigilância e controle vetorial da doença de Chagas. Brasília, DF: Organização Pan-Americana da Saúde, 2006, 40 p.

ANEXO 5 - PRANCHA VISANDO O RECONHECIMENTO DE TRIATOMÍNEOS



ANOTAÇÕES



Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Laboratório de Doenças Parasitárias
Av. Brasil, 4365, Manguinhos
CEP 21.040-360 - Rio de Janeiro - RJ

Tel.: (21) 2562-1229



Ministério da Saúde

FIORCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Divisão Regional para a América Latina e Caribe da Organização Mundial da Saúde

Apoio:

Dept. de Controle
de Doenças Tropicais
e Negligenciadas, OMS

